

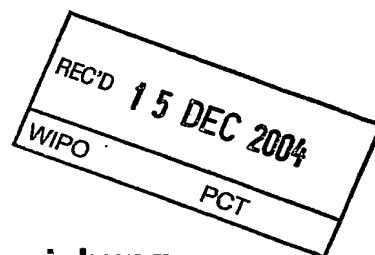
55116

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP04/13560

PCT/EP200 4 / 0 1 3 5 6 0  
30.11.04

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 103 56 631.7

**Anmeldetag:** 2. Dezember 2003

**Anmelder/Inhaber:** BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen/DE

**Bezeichnung:** 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase als herbizides Target

**IPC:** C 12 N, C 12 Q, A 01 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 7. September 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Faust

BEST AVAILABLE COPY

## 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase als herbizides Target

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase, welche bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen sowie chlorotische Blätter bedingt als Target für Herbizide. In diesem Rahmen werden neue Nukleinsäuresequenzen umfassend die SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO: 7 sowie entsprechende funktionelle Äquivalente bereitgestellt. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase sowie dessen funktioneller Äquivalente in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung sowie die Verwendung dieser über das Verfahren identifizierten Verbindungen als Herbizide oder Wachstumsregulatoren.

Das grundlegende Prinzip, Herbizide über Inhibierung eines definierten Targets zu identifizieren, ist bekannt (z.Bsp. US 5,187,071, WO 98/33925, WO 00/77185). Generell besteht ein großer Bedarf, Enzyme zu detektieren, welche neue Targets für Herbizide darstellen könnten. Gründe hierfür sind auftretende Resistenzproblematiken von an bereits bekannten Targets wirkenden herbiziden Wirkstoffen und das ständige Bemühen neue herbizide Wirkstoffe zu identifizieren, die sich durch einen möglichst breiten Wirkungsbereich, ökologische und toxikologische Verträglichkeit und/oder geringe Aufwandmengen auszeichnen.

Die Detektion von neuen Targets ist in der Praxis mit großen Schwierigkeiten verbunden, da die Hemmung eines Enzyms, das Bestandteil eines Stoffwechselweges ist, häufig das Wachstum der Pflanze nicht weiter beeinflusst. Dies kann daran liegen, dass die Pflanze auf alternative Stoffwechselwege ausweicht, deren Existenz nicht bekannt ist, oder dass das inhibierte Enzym nicht limitierend für den Stoffwechselweg ist. Ferner zeichnen sich pflanzliche Genome durch eine große funktionelle Redundanz aus. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* liegen funktional äquivalente Enzyme im Vergleich zu Insekten oder Säugern häufiger in Genfamilien vor (Nature, 2000, 408(6814):796-815). Diese Annahme wird experimentell bestätigt durch die Tatsache, dass grosse Gen-Knock-out-Programme durch T-DNA- oder Transposoninsertion in *Arabidopsis* bisher weniger ausgeprägte Phänotypen lieferten als erwartet (Curr. Op. Plant Biol. 4, 2001, pp.111-117).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, neue Targets zu identifizieren, die für das Wachstum von Pflanzen essentiell sind bzw. deren Inhibierung für die Pflanze zu einem verminderten Wachstum führen, sowie Verfahren bereitzustellen, welche zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider und/oder wachstumsregulatorischer Wirkung geeignet sind.

Die Aufgabe wurde gelöst durch die Verwendung eines Polypeptides mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase in einem Verfahren zur Identifizierung von Herbiziden.

- 5 An dieser Stelle werden nun weitere der in der Beschreibung verwendeten Begriffe definiert.

"Affinitäts-Tag": Bezeichnet ein Peptid oder Polypeptid, dessen kodierende Nukleinsäuresequenz mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz direkt oder mittels eines

- 10 Linkers über gängige Klonierungstechniken fusioniert werden kann. Das Affinitäts-Tag dient zur Isolierung, Anreicherung und/oder gezielten Aufreinigung des rekombinanten Zielproteins mittels Affinitäts-Chromatographie aus Gesamtzellextrakten. Der oben erwähnte Linker kann vorteilhaft eine Protease-Schnittstelle (z.B. für Thrombin oder Faktor Xa) enthalten, wodurch das Affinitäts-Tag bei Bedarf vom Zielprotein abgespalten werden kann. Beispiele für gängige Affinitäts-Tags sind das "His-Tag" z.B. von Qiagen, Hilden, "Strep-Tag", das "Myc-Tag" (Invitrogen, Carlsberg), das aus einer Chitin bindenden Domäne und einem Intein bestehende Tag von New England Biolabs, das Maltose-bindende Protein (pMal) von New England Biolabs und das sogenannte CBD-Tag von Novagen. Der Affinitäts-Tag kann dabei am 5'- oder 3'-Ende der
- 20 kodierenden Nukleinsäuresequenz mit der für das Zielprotein kodierenden Sequenz angebracht sein.

"Aktivität": Der Begriff "Aktivität" beschreibt die Fähigkeit eines Enzyms, ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln. Die Aktivität kann in einem sogenannten Aktivitätstest über

25 die Zunahme des Produktes, die Abnahme des Substrates (oder Eduktes) oder die Abnahme eines spezifischen Cofaktors oder über eine Kombination aus mindestens zwei der vorstehend genannten Parameter in Abhängigkeit einer definierten Zeitspanne bestimmt werden.

- 30 "Expressionskassette": Eine Expressionskassette enthält eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft mit mindestens einem genetischen Kontrollelement, wie einem Promotor, sowie vorteilhaft mit einem weiteren Kontrollelement, wie einem Terminator. Die Nukleinsäuresequenz der Expressionskassette kann beispielsweise eine genomische oder eine komplementäre DNA-Sequenz oder eine RNA-
- 35 Sequenz sowie halb- oder vollsynthetische Analoga davon sein. Diese Sequenzen können in linearer oder zirkulärer Form, extra-chromosomal oder integriert in das Genom vorliegen. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen werden oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.
- 40

Auch artifizielle Nukleinsäuresequenzen sind hierbei geeignet, solange sie die Expression eines durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierten Polypeptides mit der Aktivität der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase in einer Zelle oder einem Organismus ermöglichen. Beispielsweise können synthetische Nukleotid-Sequenzen erzeugt werden, die bezüglich der Kodon-Nutzung des von den zu transformierenden Organismen optimiert wurden.

Alle vorstehend erwähnten Nukleotid-Sequenzen sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragment-Kondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleotidbausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise in bekannter Weise nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente so manipuliert werden, dass eine Nukleotid-Sequenz mit korrekter Leserichtung und korrektem Leseraster erhalten wird. Die Verbindung der Nukleinsäure-Fragmente untereinander erfolgt über allgemeine Klonierungstechniken wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, "Experiments with Gene Fusions", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994) beschrieben sind.

**"Funktionelle Verknüpfung":** Unter einer funktionellen oder operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung regulativer Sequenzen bzw. genetischer Kontrollelemente derart, daß jede der regulativen Sequenzen bzw. jedes der genetischen Kontrollelemente ihre Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

**"Funktionelle Äquivalente"** beschreiben prinzipiell hier Nukleinsäuresequenzen, die unter Standardbedingungen mit einer Nukleinsäuresequenz oder Teilen einer Nukleinsäuresequenz zu hybridisieren und befähigt sind, die Expression der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase in einer Zelle oder einem Organismus zu bewirken.

Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 10-50 bp, vorzugsweise 15-40 bp beispielsweise der konservierten oder sonstigen Bereiche, die über Vergleiche mit anderen verwandten Genen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit einer Länge von 100-500 bp oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure/Oligonukleotid, der Länge des Fragmentes oder der vollständi-

ge Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart, d.h. DNA oder RNA, für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

5

Unter Standardhybridisierungsbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x

10

SSC, 50% Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen

5

Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50% in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen

für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory,

20

1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fach-

mann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds),

25

1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

30

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man weiterhin auch Nukleinsäuresequenzen die mit einer bestimmten Nukleinsäuresequenz („ursprüngliche Nukleinsäuresequenz“) bis zu einem definierten Prozentsatz homolog bzw. identisch sind und die gleiche Aktivität der ursprünglichen Nukleinsäuresequenzen aufweisen, ferner insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen dieser Nukleinsäuresequenzen. Entsprechende Definitionen finden sich an geeigneten Stellen der Beschreibung.

35

Es werden weiterhin auch solche Nukleotidsequenzen unter den Begriffes des funktionellen Äquivalentes durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 7 erhält. Beispielhaft können solche Modifikationen durch dem

40

Fachmann geläufige Techniken, wie "Site Directed Mutagenesis", "Error Prone PCR", "DNA-shuffling" (Nature 370, 1994, pp.389-391) oder "Staggered Extension Process" (Nature Biotechnol. 16, 1998, pp.258-261) erzeugt werden. Ziel einer solchen Modifika-

tion kann z.B. die Einfügung weiterer Restriktionsenzymchnittstellen, die Entfernung von DNA zur Verkürzung der Sequenz, der Austausch von Nukleotiden zur Codon-Optimierung oder das Hinzufügen weiterer Sequenzen sein. Proteine, die über modifizierte Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, müssen trotz abweichender Nukleinsäuresequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen.

Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch adaptierte Nukleinsäuresequenzen bzw. die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

“Genetische Kontrollsequenz” beschreibt Sequenzen, die einen Einfluss auf die Transkription und gegebenenfalls Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in prokaryotischen oder eukaryontischen Organismen haben. Beispiele hierfür sind Promotoren, Terminatoren oder sogenannte “enhancer” Sequenzen. Zusätzlich zu diesen Kontrollsequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch so modifiziert worden sein, dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression des Zielgens modifiziert, also erhöht oder erniedrigt wurde. Die Auswahl der Kontrollsequenz erfolgt abhängig vom Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus. Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Region, Introns oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen. Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, sowie die Chromatinstruktur beeinflussende Sequenzen (z.B. Matrix attachment regions (MAR's)) die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135), Kälte- und Trockenstress (Plant Cell 1994, (6): 251-264) und Hitzestress (Molecular & General Genetics, 1989, 217(2-3): 246-53) beschrieben.

“Homologie” zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptidsequenzen wird durch die Identität der Nukleinsäuresequenz/Polypeptidsequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge definiert, die durch Vergleich mit Hilfe des BESTFIT-Alignments (nach Needleman and Wunsch 1970, J. Mol. Biol. 48; 443-453) unter Einstellung folgender Parameter für Aminosäuren

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2.912

Average Mismatch: -2.003

berechnet wird.

und die folgenden Parameter für Nukleinsäuren

5 Gap Weight: 50 Length Weight: 3  
Average Match: 10.000 Average Mismatch: 0.000

Anstelle des Begriff "homolog" oder "Homologie" wird im Folgenden auch gleichbedeutend der Begriff Identität verwendet.

10

"Mutationen" von Nuklein- oder Aminosäuresequenzen umfassen Substitutionen (=Ersetzungen), Additionen (Hinzufügung), Deletionen (Löschung), Inversion (Veränderungen) oder Insertionen (Einfügungen) eines oder mehrerer Nukleotidreste, wodurch sich auch die entsprechende Aminosäuresequenz des Zielproteins mittels Substitution, Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren verändern kann, wobei jedoch insgesamt die funktionellen Eigenschaften des Zielproteins im wesentlichen beibehalten werden.

20 "Natürliche genetische Umgebung" meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an 5' oder 3' Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 100 bp, besonders bevorzugt mindestens 500 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, am meisten bevorzugt mindestens 5000 bp.

30 "Pflanzen" im Sinne der Erfindung sind Pflanzenzellen, -gewebe, -organe oder ganzen Pflanzen wie Samen, Knollen, Blüten, Pollen, Früchte, Sämlinge, Wurzeln, Blätter, Stengel oder sonstige Pflanzenteile zu verstehen. Außerdem ist unter Pflanzen Vermehrungsmaterial wie Samen, Früchte, Sämlinge, Stecklinge, Knollen, Schnitte oder Wurzelstöcke zu verstehen.

35 „2-Methyl-6-Solanylbenzochinon“ steht hier synonym für 2-Methyl-6-(4,8,12,16,20,24,28,32,36-nonamethyl-heptatriaconta-3,7,11,15,19,23,27,31,35-nonaenyl)-benzene-1,4-diol.

„2-Methyl-6-Solanylbenzochinol“ steht hier synonym für 2-Methyl-6-(4,8,12,16,20,24,28,32,36-nonamethyl-heptatriaconta-3,7,11,15,19,23,27,31,35-nonaenyl)-[1,4]benzoquinone.

„Plastochinon“ steht hier synonym für 2,3-Dimethyl-5-(4,8,12,16,20,24,28,32,36-nonamethyl-heptatriaconta-3,7,11,15,19,23,27,31,35-nonaenyl)-benzene-[1,4]-bezoquinone

- 5 „Plastochinol“ steht hier synonym für 2,3-Dimethyl-5-(4,8,12,16,20,24,28,32,36-nonamethyl-heptatriaconta-3,7,11,15,19,23,27,31,35-nonaenyl)-benzene-1,4-diol

- “Polypeptid mit der Aktivität der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase” oder 2-Methyl-6-Solanylbenzochinol-Methyltransferase bezeichnet hier ein Enzym,  
10 welches in der Lage ist, 2-Methyl-6-solanylbenzochinol zu Plastochinol oder 2-Methyl-6-solanylbenzochinon zu Plastochinon zu methylieren.

- 5 “Reaktionszeit” bezeichnet die Zeit, die man für die Durchführung eines Testes zur Ermittlung der enzymatischen Aktivität bis zum Erhalt einer signifikanten Aussage über eine enzymatische Aktivität benötigt und hängt sowohl von der spezifischen Aktivität des im Test eingesetzten Proteins als auch von der verwendeten Methode und der Empfindlichkeit der verwendeten Geräte ab. Dem Fachmann ist die Ermittlung der Reaktionszeiten bekannt. Bei auf photometrischen Methoden basierenden Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung liegen die Reaktionszeiten  
20 beispielsweise im allgemeinen zwischen > 0 bis 720 Minuten.

- “Rekombinante DNA” beschreibt eine Kombination von DNA-Sequenzen herstellbar durch rekombinante DNA-Technologie.

- 25 “Rekombinante DNA-Technologie” allgemein bekannte Techniken zur Fusionierung von DNA-Sequenzen (z.B. beschrieben in Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

- 30 “Replikationsursprünge” gewährleisten die Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in Mikroorganismen und Hefen z.B. der pBR322 ori oder der P15A ori in E. coli (Sambrook et al.: “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und der ARS1 ori in Hefe (Nucleic Acids Research, 2000, 28(10): 2060-2068).

- 35 “Reportergene” kodieren für leicht quantifizierbare Proteine. Über Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung (Eigenfarbe) oder Enzymaktivität kann mittels dieser Gene eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes vorgenommen werden. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das “green fluorescence  
40 protein” (GFP) (Gerdes HH and Kaether C, FEBS Lett. 1996; 389(1):44-47; Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffel SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997), die Chloramphenicolacetyltransferase, eine Luziferase (Giacomin, Plant Sci 1996, 116:59-



72; Scikantha, J Bact 1996, 178:121; Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992 10:324-414), sowie Luziferasegene, im allgemeinen die  $\beta$ -Galactosidase oder die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907) oder das Ura3-Gen.

- 5 "Selektionsmarker" verleihen eine Resistenz gegen Antibiotika, oder andere toxische Verbindungen: Beispielhaft zu nennen seien hier das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das eine Resistenz gegen die Aminoglycosid-Antibiotika Neomycin (G 418), Kanamycin, Paromycin (Deshayes A et al., EMBO J. 4 (1985) 2731-2737), das sul Gen kodierend für eine mutierte Dihydropteroat Synthase (Guerineau F et al., Plant Mol Biol. 1990; 15(1):127-136), das Hygromycin B Phosphotransferase-Gen (Gen Bank Accession NO: K 01193) und das shble Resistenzgen, das eine Resistenz gegen die Bleomycin Antibiotika wie z.B. Zeocin verleiht. Weitere Beispiele für Selektionsmarker-Gene sind Gene, die eine Resistenz gegen 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder Phosphinotricin etc. verleihen oder solche, die eine Antimetaboliten-

- 10 Resistenz verleihen, zum Beispiel das dhfr-Gen (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994) 142-149). Geeignet sind ferner Gene wie trpB oder hisD (Hartman SC and Mulligan RC; Proc Natl Acad Sci U S A. 85 (1988) 8047-8051). Geeignet ist auch das Gen der Mannose-Phosphat Isomerase (WO 94/20627), das ODC (Ornithin-Decarboxylase) Gen (McConlogue, 1987 in: Current Communications in Molecular Biology, Cold-Spring Harbor Laboratory, Hrsg.) oder die Deaminase aus Aspergillus terreus (Tamura K et al., Biosci Biotechnol Biochem. 59 (1995) 2336-2338).

- 15 "Transformation" beschreibt einen Prozess zur Einführung heterologer DNA in eine pro- oder eukaryontische Zelle. Mit einer transformierten Zelle ist nicht nur das Produkt des Transformationsprozesses an sich beschrieben, sondern auch alle transgenen Nachkommen des durch die Transformation hergestellten transgenen Organismus

- 20 "Target/Target Protein": ein Polypeptid codiert über die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, welches ein Enzym im klassischen Sinne sein kann oder z.B. ein Strukturprotein, ein für Entwicklungsprozesse relevantes Protein, Regulationsproteine wie Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen, Rezeptoren, Untereinheiten von Kanälen, Transportproteine, regulatorische Untereinheiten die einem Enzymkomplex eine substrat- oder Aktivitätsregulation verleihen. Allen Targets oder Wirkorten gemein ist dabei, dass deren funktionale Anwesenheit essentiell für das Überleben oder die normale Entwicklung und das Wachstum sind.

- 25 "Transgen": Bezogen auf eine Nukleinsäuresequenz, eine Expressionskassette oder einen Vektor enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einen Organismus transformiert mit der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor beschreibt der Ausdruck transgen alle solche durch gentechnische Methoden hergestellten Konstruktionen, in denen sich entweder die Nukleinsäuresequenz des Zielproteins oder eine mit der Nukleinsäuresequenz des Zielproteins

funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz oder eine Kombination der vorstehend genannten Möglichkeiten sich nicht in ihrer natürlichen genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden. Die Modifikation kann hier beispielsweise über Mutation eines oder mehrerer Nukleotidreste der entsprechenden Nukleinsäuresequenz erreicht werden.

In der vorliegenden Anmeldung wird auf die folgende Sequenzen Bezug genommen:

	Bezeichnung	Organismus	Sequenz
10	SEQ ID NO:1	N. tabacuum	NA NV
	SEQ ID NO:2	N. tabacuum	AA NV
	SEQ ID NO:3	A. thaliana	NA NV
	SEQ ID NO:4	A. thaliana	AA NV
	SEQ ID NO:5	A. thaliana	NA C(31)+N (49)
5	SEQ ID NO:6	A. thaliana	AA C(31)+N (49)
	SEQ ID NO:7	A. thaliana	NA C(31)+N (51)
	SEQ ID NO:8	A. thaliana	AA C(31)+N (51)
	SEQ ID NO:9	N. tabacuum	NA TS
	SEQ ID NO:10	N. tabacuum	AA TS

\*) Nicotiana = N.

Arabidopsis = A.

AA=amino acid sequence

NA= nucleic acid sequence

25 C ()+N () = C und N-terminal verkürzte Sequenz (Angabe der verkürzten

AS in Bezug auf SEQ ID NO:3)

NV = nicht verkürzte Sequenz

TS= Teilsequenz

30 Plastochinon ist ein essenzieller Cofaktor der pflanzlichen Photosynthese. Es sorgt als zwei Elektronen Redoxpartner für den Elektronentransfer vom Photosystem II auf den Cytochrom-b<sub>6</sub>/f Komplex und dient ferner als Cofaktor bei der Caroteniodbiosynthese. Die Biosynthese des Plastochinons zweigt von der aromatischen Aminosäurebiosynthese ab. Die Homogentisat Solanyltransferase überträgt einen Solanylrest auf Homogentisat. Das entstehende 2-Methyl-6-solanylbenzochinol (MSBQ) wird anschließend durch die 2-Methyl-6-Solanylbenzochinol-Methyltransferase (MSBQ-MT) zum Plastochinol methyliert. MSBQ-MT benötigt als Methylgruppendonator S-Adenosylmethionin. Die MSBQ-MT ist darüber hinaus an der Tocopherolbiosynthese beteiligt, da sie neben MSBQ auch 2-Methyl-6-phytylbenzochinol (MPBQ) als Substrat akzeptiert. Beide

40 Enzyme sind im Chloroplasten lokalisiert. Homogentisat wird im Cytosol durch die Hydroxyphenylpyruvat Dioxgenase (HPPD) aus p-Hydroxyphenylpyruvat gebildet. Alle

Enzyme der Plastochinon Biosynthese liegen mittlerweile cloniert aus höheren Pflanzen vor.

- 5 MSBQ-MT Enzyme haben sich im Laufe der Evolution vermutlich unabhängig in Cyanobakterien und höheren Pflanzen entwickelt, da zwar Funktionshomologie, nicht aber Sequenzhomologie zwischen diesen Enzymen aus Cyanobakterien und höheren Pflanzen besteht (Cheng et al. 2003 Plant Cell 15, S. 2343-2356).

- 10 Die Bedeutung der Plastochinon Biosynthese für die Fitness von Pflanzen wird anhand beschriebener KO Mutanten verdeutlicht. Arabidopsis knock out-Mutanten der HPPD (pds1) und der Homogentisat Solanyltransferase (pds2) sind Keimungslethal unter photoautotrophen Bedingungen und enthalten kein Plastochinon (Norris et al. 1998, Plant Cell 7, S.2139-2149). Sehr ähnliche Phänotypen weisen knock out-Mutanten der MSBQ-MT auf (vte3-2, Cheng et al. 2003 Plant Cell 15, S. 2343-2356 und apg1, Motohashi et al. 2003 The Plant Journal 34, S. 719-731), die in Erde nicht überleben und auf sucrosehaltigen Agarmedien blassgrün und wachstumsretardiert sind.

HPPD ist darüber hinaus der Wirkort von Herbiziden des Triketon Typs. Diese Daten legen nahe, dass auch die pflanzliche Homogentisat Solanyltransferase sowie die MSBQ-MT als Herbizidtarget geeignet sein könnten. Inhibitoren dieser Enzyme, die sich als Herbizide eignen sind bisher nicht bekannt.

- 20 Cheng et al. 2003 Plant Cell 15, S. 2343-2356 beschreiben darüber hinaus ein schwaches vte3-1 Allel. Eine Punktmutation im Arabidopsis MSBQ-MT-Gen führt hier zu einer geringen Abnahme der Plastochinonmenge um 17% gegenüber dem Wildtyp. Die vte3-1 Mutanten sind jedoch nicht wesentlich in Wachstum und Fitness beeinträchtigt.

- 30 In der vorliegenden Erfindung konnte überraschend gezeigt werden, dass nicht nur der totale Verlust der MSBQ-MT-Aktivität, wie in den null Mutanten vte3-1 und apg1 zur Beeinträchtigung der Vitalität führt. In transgenen Tabakpflanzen, die ein MSBQ-MT-Antisense-Gen enthalten und die nur teilweise verminderte MSBQ-MT Aktivitäten aufweisen, konnte gezeigt werden, dass auch kleine Abnahmen der MSBQ-Aktivität zur drastischen Reduktion der Vitalität führen. Damit ist die besondere Eignung der MSBQ-MT als Herbizidtarget gezeigt.

- 35 Ein Nachteil bezüglich der Verwendung der MSBQ-MT im effizienten Hochdurchsatz-Screening besteht darin, dass die Expression der MSBQ-MT aus Arabidopsis in E.coli prinzipiell möglich ist (Cheng et al. 2003 Plant Cell 15, S. 2343-2356), aber nur sehr geringe MSBQ-MT-Aktivität liefert, die für ein effizientes Hochdurchsatz-Screening nicht ausreichen ist.

40

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschend gefunden, dass sich N- und C-terminal verkürzte Aminosäuresequenzen der MSBQ-MT besonders gut im Ge-

gensatz zu den entsprechenden Vollängensequenzen exprimieren lassen und sich somit für die Verwendung in Testsystemen zur Identifizierung von Herbiziden besonders gut eignen.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase in einem Verfahren zur Identifizierung von Herbiziden, welche bevorzugt durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, welche

10 i) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 oder in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

ii) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 oder in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder

15 iii) ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten lässt,

20 wobei sich das funktionelle Äquivalent iii) sich durch eine gleiche Funktionalität auszeichnet, d.h. es kodieren für ein Polypeptid mit der Aktivität der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase.

Der Begriff "umfassend" oder "umfassen" bezogen auf Nukleinsäuresequenzen meint, 25 daß die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz am 3' und/oder am 5' Ende zusätzliche Nukleinsäuresequenzen enthalten kann, wobei die Länge der zusätzlichen Nukleinsäuresequenzen 18 bp am 5' und 18 bp 3' Ende der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, vorzugsweise 6 bp am 5' und 6 bp am 3' Ende nicht überschreitet, besonders bevorzugt 0 bp am 5' und 0 bp am 3' Ende.

30

Erfindungsgemäße funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:3 werden durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz abgeleitet, die eine Identität gemäß a) iii) weisen eine Identität mit der SEQ ID No:4 von mindestens 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65% oder 66% vorzugsweise mindestens 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72% oder 35 73% vorzugsweise mindestens 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% oder 80% bevorzugt mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92% oder 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% aufweist.

40 Beispiele für geeignete funktionelle Äquivalente gemäß iii) sind auch die pflanzliche Nukleinsäuresequenzen codierend für 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase aus Spinat (Genbank Acc. Nr. X56963).

Die vorstehend genannten Sequenzen ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

- 5 Des weiteren ist die Verwendung einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase, deren Aminosäuresequenz, die von einer Nukleinsäuresequenz gemäß i), ii) oder iii) kodiert wird, um mindestens 20 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 21-32 Aminosäuren, besonders bevorzugt mindestens 33-48 Aminosäuren, ganz besonders bevorzugt mindestens 49, 50 oder 51 Aminosäuren am am C-terminus und
- 10 um mindestens 20 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 21-26 Aminosäuren, besonders bevorzugt mindestens 27-28 Aminosäuren, ganz besonders bevorzugt mindestens 29, 30 oder 31 Aminosäuren am N-terminus verkürzt ist, bevorzugt.

- 15 Die Verwendung von einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase, deren Aminosäuresequenz von einer Nukleinsäuresequenz umfassend

- iv) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:5 oder in SEQ ID NO:7 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

- 20 v) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:6 oder in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt;

ist hierbei besonders bevorzugt.

25

- Sämtliche oben genannten Nukleinsäuresequenzen stammen vorzugsweise aus einer Pflanze.

30

Des weiteren werden in diesem Rahmen pflanzliche Nukleinsäuresequenzen kodierend für ein Polypeptid mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase umfassend

- i) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:5 oder in SEQ ID NO:7 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

35

- ii) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:6 oder in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder

40

- iii) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ab-

leiten läßt, und um mindestens 20 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 21-32 Aminosäuren, besonders bevorzugt mindestens 33-48 Aminosäuren, ganz besonders bevorzugt mindestens 49, 50 oder 51 Aminosäuren am C-terminus und um mindestens 20 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 21-26 Aminosäuren, besonders bevorzugt mindestens 27-28 Aminosäuren, ganz besonders bevorzugt mindestens 29, 30 oder 31 Aminosäuren am N-terminus verkürzt ist

beansprucht sowie die durch die Nukleinsäuresequenzen kodierten Polypeptide.

10 Der im folgenden verwendete Begriff "erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz" steht für eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase, umfassend

5 i) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 oder in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

10 ii) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 oder in SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

20 iii) ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten läßt;

25 iv) vorzugsweise

30 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz oder ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten läßt;

b) und um mindestens 20 Aminosäuren am C-terminus und um mindestens 20 Aminosäuren am N-terminus verkürzt ist.

35 Die verkürzten Aminosäuresequenzen kodierend für ein Polypeptid mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase werden besonders bevorzugt durch

40 v) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:5 oder in SEQ ID NO:7 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

## 14

- vi) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:6 oder in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt;

5 kodiert.

Ein durch erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen i), ii) oder iii) kodiertes Polypeptid mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase wird im folgenden der Einfachheit halber als "MSM" bezeichnet. Die durch die erfindungsgemä-  
10 ße Nukleinsäuresequenzen iv), v) oder vi) kodierten verkürzten Polypeptide werden im folgenden als "VMSM" bezeichnet. Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen iv), v) oder vi) werden als "VMSM Sequenz" bezeichnet.

15 Die Genprodukte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellen neue Targets für Herbizide und Wachstumsregulatoren, bevorzugt Herbizide dar, welche die Bereitstellung neuer Herbizide zur Bekämpfung unerwünschter Pflanzen ermöglichen.

Unter unerwünschten Pflanzen sind im weitesten Sinne alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind, zum Beispiel:

20 Dikotyle Unkräuter der Gattungen: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*,  
25 *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus*, *Taraxacum*.

Monokotyle Unkräuter der Gattungen: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*,  
30 *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Apera*.

Die SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 oder Teile der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenz können für die Herstellung von Hybridisierungssonden verwendet werden. Die Herstellung dieser Sonden sowie die Durchführung der Experimente ist bekannt. Sie kann zum Beispiel über die gezielte Herstellung  
35 radioaktiver oder nicht radioaktiver Sonden mittels PCR und der Verwendung von entsprechend markierten Oligonukleotiden mit anschließenden Hybridisierungsexperimenten erfolgen. Die hierfür erforderlichen Technologien sind beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) aufgeführt. Die entsprechenden  
40 Sonden können weiterhin mittels Standardtechnologien (Lit. SDM bzw. random Mutagenesis) so modifiziert werden, dass sie für weitere Zwecke eingesetzt werden können,

## 15

z.B. als Sonde, die spezifisch zu mRNA sowie den entsprechenden codierenden Sequenzen hybridisiert zwecks Analyse der entsprechenden Sequenzen in anderen Organismen.

- 5 Die oben genannten Sonden können für die Detektion und Isolation von funktionellen Äquivalenten (Definition s.o.) aus anderen Pflanzenspezies aufgrund von Sequenzidentitäten verwendet werden. Hierbei wird z.B. ein Teil oder die gesamte Sequenz der entsprechenden Nukleinsäuresequenz als Sonde zum Screening in einer genomischen oder cDNA Bank der entsprechenden Pflanzenspezies oder in einer Computer-
- 10 Recherche nach Sequenzen funktioneller Äquivalente in elektronischen Datenbanken verwendet.

Bevorzugte Pflanzenspezies sind hierbei die bereits eingangs erwähnten unerwünschten Pflanzen.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Expressionskassetten enthaltend

a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit VMSM Sequenz;

20 b) zusätzliche Funktionselemente; oder

c) eine Kombination aus a) und b);

sowie die Verwendung von Expressionskassetten enthaltend

25

a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz;

b) zusätzliche Funktionselemente; oder

30

c) eine Kombination aus a) und b);

zur Expression von MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM zur Verwendung in in vitro Testsystemen. Beide Ausführungsformen der vorstehend beschriebenen Expressionskassetten werden im folgenden als erfindungsgemäße Expressionskassette bezeichnet.

35

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette am 5'-Ende der kodierenden Sequenz einen Promotor und am 3'-Ende Transkriptions-Terminations-Signal und gegebenenfalls weitere genetische Kontrollsequenzen, welche mit der dazwischenliegenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft sind.

40



Unter den erfindungsgemäßen Expressionskassetten sind auch Analoga zu verstehen, die zum Beispiel durch eine Kombination der einzelnen Nukleinsäuresequenzen auf einem Polynukleotid (Mehrfachkonstrukte), auf mehreren Polynukleotiden in einer Zelle (Kotransformation) oder durch sequenzielle Transformation zustande kommen können.

Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen nach Punkt a) für die erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder für Vektoren enthaltend erfindungsgemäße Expressionskassetten sind beispielsweise Promotoren wie *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lacIq*-, T7-, T5-, T3-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, SP6-,  $\lambda$ -PR- oder im  $\lambda$ -PL-Promotor, die zur Expression von MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM, in gram-negativen Bakterienstämmen verwendet werden können.

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den Promotoren *amy* und *SPO2*, die zur Expression von MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM in gram-positiven Bakterienstämmen verwendet werden können, sowie in den Hefe- oder Pilzpromotoren *AUG1*, *GPD-1*, *PX6*, *TEF*, *CUP1*, *PGK*, *GAP1*, *TPI*, *PHO5*, *AOX1*, *GAL10/CYC1*, *CYC1*, *OliC*, *ADH*, *TDH*, *Kex2*, *MFa* oder *NMT* oder Kombinationen der vorstehend genannten Promotoren enthalten (Degryse et al., *Yeast* 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Romanos et al. *Yeast* 1992 Jun;8(6):423-88; Benito et al. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 207-220 (1998); Cregg et al. *Biotechnology (N Y)* 1993 Aug;11(8):905-10; Luo X., *Gene* 1995 Sep 22;163(1):127-31; Nacken et al., *Gene* 1996 Oct 10;175(1-2):253-60; Turgeon et al., *Mol Cell Biol* 1987 Sep;7(9):3297-305) oder den Transkriptions-terminatoren *NMT*, *Gcy1*, *TrpC*, *AOX1*, *nos*, *PGK* oder *CYC1* (Degryse et al., *Yeast* 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Brunelli et al. *Yeast* 1993 Dec9(12): 1309-18; Frisch et al., *Plant Mol. Biol.* 27 (2), 405-409 (1995); Scorer et al., *Biotechnology (N.Y.)* 12 (2), 181-184 (1994), Genbank acc. number Z46232; Zhao et al. Genbank acc number : AF049064; Punt et al., (1987) *Gene* 56 (1), 117-124), die zur Expression von MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM in Hefestämmen verwendet werden können.

Als zur Expression in Insektenzellen geeignete genetische Kontrollsequenzen sind exemplarisch der Polyhedrin-Promotor sowie der p10-Promotor (Luckow, V.A. and Summers, M.D. (1988) *Bio/Techn.* 6, 47-55) zu nennen.

Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression der MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM in Zellkultur sind neben Polyadenylierungssequenzen wie z.B. aus Simian Virus 40 eukaryontische Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40.

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM in Pflanzen sind in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., *Cell* 21(1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., *Plant. Mol. Biol.* 22 (1993)], SSU, OCS,

LEB4, USP, STLS1, B33, NOS; FBPaseP (WO 98/18940) oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten, vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt sind Promotoren viralen Ursprungs wie der Promotor des 35S-

- 5 Transkriptes des Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294; Odell et al., Nature 313 (1985), 810-812). Weitere bevorzugte konstitutive Promotoren sind zum Beispiel der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al., Plant Mol Biol 1995, 29:637-649), die Promotoren der
- 10 vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991).

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor als genetische Kontrollsequenz enthalten, durch den die Expression des exogenen Gens

5 in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al., Plant Mol Biol 22 (1993), 361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer (EP-A-0388186), ein durch Tetracyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw.

20 ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können ebenfalls verwendet werden.

Geeignet sind ferner Promotoren, die eine gewebe- oder organspezifische Expression, z.B. in Antheren, Ovarien, Blüten und Blütenorganen, Blättern, Schließzellen, Trichomen, Stengel, Leitgeweben, Wurzeln und Samen vermitteln. Ebenfalls geeignet sind

25 hier neben den oben genannten konstitutiven Promotoren, insbesondere solche Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine Expression in Samen und pflanzlichen Embryonen steuern. Samenspezifische Promotoren sind zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200, Bustos MM et al., Plant Cell. 1989;1(9):839-53), des 2S Albumins (Joseffson LG et al., J Biol Chem 1987, 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al., Mol Gen Genet. 1989;215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al., Molecular & General Genetics 1991, 225(3):459-67) des Napin Gens (Stalberg K, et al., L. Planta 1996, 199:515-519), des Saccharosebindepoteins (WO 00/26388) oder der LeB4-Promotor (Bäumlein H et al., Mol Gen Genet 1991, 225: 121-

35 128; Fiedler, U. et al., Biotechnology (NY) (1995), 13 (10) 1090).

40 Weitere als genetische Kontrollsequenzen geeignete Promotoren sind beispielsweise spezifische Promotoren für Knollen, Speicherwurzeln oder Wurzeln, wie beispielsweise

der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel, der Promotor der Stärke Synthase (GBSS1) oder der Sporamin Promotor, fruchtspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtspezifische Promotor aus Tomate (EP-A 409625), fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794), blütenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder spezifische Plastiden- oder Chromoplasten-Promotoren, wie beispielsweise der RNA-Polymerase Promotor (WO 97/06250) oder auch der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nr U87999) oder ein anderer Nodien-spezifischer Promotor wie in EP-A 249676 können vorteilhaft verwendet werden.

Unter zusätzlichen Funktionselementen b) sind beispielhaft aber nicht einschränkend Reportergene, Replikationsursprünge, Selektionsmarker und sogenannte Affinitäts-Tags, fusioniert mit MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM direkt oder mittels eines Linkers optional enthaltend eine Protease-Schnittstelle zu verstehen. Weitere geeignete zusätzliche Funktionselemente sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Peroxisom, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Erfindungsgemäß sind ferner Vektoren, die mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und/oder der erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthalten.

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt als Vektor oder den verwendeten Nukleinsäuresequenzen bestehen.

Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.

- Die erfindungsgemäße Expressionskassette sowie davon abgeleitete Vektoren können zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien (z.B. der Gattung Synechocystes, Anabaena, Calothrix, Scytonema, Oscillatoria, Plectonema und Nostoc), Proteobakterium wie etwa Magnetococcus sp. MC1, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen und eukaryontischen, nicht humanen Zellen (z.B. Insektenzellen) mit dem Ziel der rekombinanten Herstellung MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM eingesetzt werden, wobei sich die Herstellung einer geeigneten Expressionskassette nach dem Organismus, in welchen das Gen exprimiert werden soll, richtet.

Vektoren enthaltend eine Expressionskassette, welche

- a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer VMSM Sequenz

- b) zusätzliche Funktionselemente, oder

- c) eine Kombination aus a) und b); enthält

sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

- In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform können die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

- Sollen neben den Nukleinsäuresequenzen weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

- Hierbei kann das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n), der Expressionskassette oder des Vektors in die entsprechenden Organismen (Transformation) prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

- Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) "Current protocols in molecular biology", John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. "Guide to Yeast Genetics and

Molecular Biology", Methods in Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen. Bei der Transformation von filamentösen Pilzen bieten sich zum einen die Herstellung von Protoplasten und Transformation mit Hilfe von PEG (Wiebe et al. (1997) Mycol. Res. 101 (7): 971-877; Proctor et al. (1997) Microbiol. 143, 2538-2591), zum anderen die Transformation unter zur Hilfe nahme von Agrobacterium tumefaciens (de Groot et al. (1998) Nat. Biotech. 16, 839-842) an.

Für dikotyle Pflanzen können die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden. Geeignete Methoden sind das biolistische Verfahren oder durch Protoplastentransformation (vergl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge), die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus et al., Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben.

Die Transformation mittels Agrobakterien sowie die für die Transformation zu verwendenden Vektoren sind dem Fachmann bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (; Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187), EP A 0 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287).

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels Agrobacterium basierender Vektoren wurde beschrieben ( Chan et al, Plant Mol. Biol. 22(1993), 491-506; Hiei et al, Plant J. 6 (1994) 271-282; Deng et al; Science in China 33 (1990), 28-34; Wilmink et al, Plant Cell Reports 11,(1992) 76-80; May et al; Biotechnology 13 (1995) 486-492; Conner und Domisse; Int. J. Plant Sci. 153 (1992) 550-555; Ritchie et al; Transgenic Res. (1993) 252-265). Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen

sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux; Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil et al; Biotechnology 11 (1992), 667-674; Ritala et al, Plant Mol. Biol 24, (1994) 317-325; Spencer et al, Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625-631) die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen ; die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z.B. WO 95/06128; EP 0513849 A1; EP 0465875 A1; EP 0292435 A1; Fromm et al, Biotechnology 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al, Plant Cell 2 (1990), 603-618; Koziel et al, Biotechnology 11(1993) 194-200; Moroc et al, Theor Applied Genetics 80 (190) 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al, s.o.; Weizen (Nehra et al, Plant J. 5(1994) 285-297).

5. Mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie Arabidopsis oder Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu; Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Die durch Transformation mit einer der oben beschriebenen Ausführungsformen einer Expressionskassette, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem Vektor, enthaltend die vorstehend genannte Expressionskassette, hergestellten transgenen Organismen sowie die mittels Expression aus dem transgenen Organismus erhältliche rekombinante VMSM sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von transgenen Organismen enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionskassette z.B. für die Bereitstellung rekombinanten Proteins und/oder die Verwendung dieser Organismen in in vivo Testsystemen.

Bevorzugte Organismen für die rekombinante Expression sind neben Bakterien, Hefen, Moose, Algen, Pilze auch eukaryontische Zelllinien.

Bevorzugte Moose sind *Physcomitrella patens* oder weitere in Kryptogamen, Bd.2, Moose, Farne, 1991, Springer Verlag (ISBN 3540536515), beschriebene Moose.

- 5 Innerhalb der Bakterien sind Bakterien der Gattung *Escherichia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung *Synechocystis*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Scytonema*, *Oscillatoria*, *Plectonema* und *Nostoc*, besonders bevorzugt *Synechocystis* oder *Anabena* bevorzugt.

- 10 Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*.

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria*, *Mortierella*, *Saprolegnia*, *Pythium*, oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) beschriebene Pilze.

- 15 Bevorzugte Pflanzen sind insbesondere ausgewählt unter monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis oder Hafer sowie dem Zuckerrohr. Ferner sind die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen insbesondere ausgewählt unter dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel, Brassicaceae wie Raps, Kresse, *Arabidopsis*, Kohlarten oder Canola; Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika; Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula; Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini, oder Lein, Baumwolle, Hanf, Flachs, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Zuckerrübe oder  
20 verschiedene Baum-, Nuss- und Weinspecies.

- Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere geeignet wie beispielsweise *C. elegans*.

- 30 Bevorzugt ist auch die Verwendung von Expressionssystemen und Vektoren, die öffentlich zugänglich oder kommerziell erhältlich sind.

- Zur Verwendung in *E. coli* Bakterien sind die typischen vorteilhaften, kommerziell erhältlichen Fusions- und Expressionsvektoren pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase beinhaltet (GST), Maltose Bindeprotein, oder Protein A, die pTrc-Vektoren (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) der "pKK233-2" von CLONTECH, Palo Alto, CA und die "pET"-, und die "pBAD"-Vektor-Serien von Stratagene, La Jolla zu nennen.

- 40 Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943),

pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123), and pYES-Derivate, pGAPZ-Derivate, pPICZ-Derivate sowie die Vektoren des "Pichia Expression Kit" (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, 5 J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzellexpressionsvektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf9, Sf21 oder Hi5 Zellen, welche über rekombinante Baculoviren infiziert werden. Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39). Weiterhin genannt seien die Baculovirus Expressionssysteme "MaxBac 2.0 Kit" und "Insect Select System" von Invitrogen, Calsbald oder "BacPAK Baculovirus Expressionssystem" von CLONTECH, Palo Alto, CA. Insektenzellen eignen sich in besonderer Weise zur Überexpression eukaryontischer Proteine, da sie posttranslationale Modifikationen der Proteine durchführen, die in Bakterien und Hefen nicht möglich sind. Die Handhabung von Insektenzellen in Zellkultur sowie ihre Infektion zur Expression von Proteinen sind dem Fachmann bekannt und können in Analogie zu bekannten Methoden erfolgen (Luckow und Summers; Bio/Tech. 6; 1988; pp:47-55; Glover and Hammes (eds) in: DNA Cloning 2, A practical Approach, Expression Systems; Second Edition, Oxford University Press, 1995; 205-244).

Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzenexpressionsvektoren finden sich wie obenstehend erwähnt in Becker, D., et al. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acid. Res. 12: 8711-8721.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiel für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC genannt in: Seed, B. (1987) Nature 329:840 oder Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40. Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.

Die transgenen Organismen, welche VMSM Sequenzen beinhalten, werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung beansprucht.



Sämtliche, oben beschriebenen Ausführungsformen der transgenen Organismen, welche MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM enthalten, werden unter dem Begriff "erfindungsgemäßer transgener Organismus" zusammengefasst.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM in einem Verfahren zur Identifizierung von Testverbindungen mit herbizider Wirkung.

10

Bevorzugt umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung die folgenden Schritte:

- i. Inkontaktbringen von MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen, die die Bindung der Testverbindung(en) an den MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM erlauben; und

5

ii. Nachweis, ob die Testverbindung an MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM aus i) bindet; oder

20

iii. Nachweis, ob die Testverbindung die Aktivität von MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM aus i) reduziert oder blockiert; oder

iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression von MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM aus i) reduziert oder blockiert.

25

Unter dem Begriff "reduziert" ist eine Verringerung der Aktivität im Vergleich zur Aktivität des nicht mit einer Testverbindung MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM von mindestens 10 %, vorteilhaft mindestens 20 %, bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt um mindestens 70 % und ganz besonders bevorzugt um mindestens 80 %, 90% oder 95% zu verstehen, unter dem Begriff "blockiert" die gänzliche, das heißt 100 %ige Blockierung der Aktivität, wobei die vorstehend genannten prozentualen Verringerungen bei einer Inhibitorkonzentration von weniger als  $10^{-4}$ M, bevorzugt weniger als  $10^{-5}$ M, besonders bevorzugt weniger als  $10^{-6}$ M und ganz besonders bevorzugt von weniger als  $10^{-7}$ M.

35

Der Nachweis gemäß Schritt (ii) des oben stehenden Verfahrens kann anhand von Techniken, welche die Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand aufzeigen, erfolgen. Hierbei kann entweder die Testverbindung oder das Enzym eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope, chemilumineszierende oder enzymatische Markierung. Beispiele für enzymatische Markierungen sind Meerrettich Peroxidase, alkalische Phosphatase oder Luziferase. Die anschließende Detektion richtet sich nach der Markierung und ist dem Fachmann bekannt.

40

Hierbei sind insbesondere fünf bevorzugte Ausführungsformen zu nennen, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch für Hochdurchsatzmethoden (High Troughput Screening, HTS) geeignet sind:

5

1. Über Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 11753-11575) läßt sich die durchschnittliche Diffusionsrate eines Fluoreszenzmoleküls in Abhängigkeit zur Masse in einem kleinen Probenvolumen bestimmen. Durch Messen der Massenänderung bzw. der daraus resultierenden veränderten Diffusionsrate einer Testverbindung beim Binden an MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM läßt sich FCS zur Bestimmung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen einsetzen. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren so konzipiert sein, dass eine durch ein Fluoreszenzmolekül markierte chemische Referenzverbindung durch weitere Testverbindungen verdrängt wird ("Verdrängungsassay").

10

15

20

25

30

2. Die Fluoreszenzpolarisation nutzt die Eigenschaft eines mit polarisiertem Licht angeregten ruhenden Fluorophors ebenfalls wieder polarisiertes Licht zu emittieren. Kann der Fluorophor allerdings während des angeregten Zustands rotieren, so geht die Polarisation des emittierten Fluoreszenzlichts mehr oder weniger verloren. Bei sonst gleichen Bedingungen (z.B. Temperatur, Viskosität, Lösungsmittel) ist die Rotation eine Funktion der Molekülgröße, womit man über das Messsignal eine Aussage über die Größe des am Fluorophor gebundenen Rests treffen kann (Methods in Enzymology 246 (1995), pp. 283-300). Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung an MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein.

35

40

3. Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer" (FRET) basiert auf der strahlungslosen Energieübertragung zwischen zwei räumlich benachbarten Fluoreszenzmolekülen unter geeigneten Bedingungen. Eine Voraussetzung ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donormoleküls mit dem Anregungsspektrum des Akzeptormoleküls. Durch Fluoreszenzmarkierung MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM und den auf Bindung Testverbindung kann mittels FRET die Bindung gemessen werden (Cytometry 34, 1998, pp. 159-179). Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Eine besonders geeignete Ausführungsform der FRET Technologie ist die "Homogenous Time Resolved Fluorescence" (HTRF), wie sie von Packard BioScience vertrieben wird.

4. Surface Enhanced-Laser Desorption/Ionisation (SELDI) in Kombination mit einem "Time of Flight" Massenspektrometer (MALDI-TOF) ermöglicht die schnelle Analyse von Molekülen auf einem Träger und kann zur Analyse von Protein-Ligand Wechselwirkungen verwendet werden (Worral et al., (1998) Anal. Biochem. 70:750-756). In einer bevorzugten Ausführungsform immobilisiert man nun MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM auf einem geeigneten Träger und inkubiert diesen mit der Testverbindung. Nach einem oder mehreren geeigneten Waschschr

5. itten kann man die an MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM zusätzlich gebundenen Moleküle der Testverbindung mittels der oben erwähnten Methodik detektieren und somit an MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM gebundene Testverbindungen selektieren.

10

5. Die Messung von Oberflächen Plasmonenresonanz basiert auf der Änderung des Brechungsindex an einer Oberfläche beim Binden einer Testverbindung an ein auf besagter Oberfläche immobilisiertes Protein. Da die Änderung des Brechungsindex für eine definierte Änderung der Massenkonzentration an der Oberfläche quasi für alle Proteine und Polypeptide identisch ist, kann diese Methode prinzipiell auf jedes Protein angewendet werden (Lindberg et al. Sensor Actuator 4 (1983) 299-304; Malmquist Nature 361 (1993) 186-187). Die Messung kann beispielsweise mit Hilfe der von Biacore (Freiburg) vertriebenen auf Oberflächen-Plasmonenresonanz basierenden Analyseautomaten in einem Durchsatz von derzeit bis zu 384 Proben pro Tag durchgeführt werden. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer Testverbindung an MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1. beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein.

20

25

Die über die oben genannten Verfahren 1 bis 5 identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein. Sämtliche, über die oben genannten Verfahren identifizierten Substanzen können anschließend in einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens auf ihre herbizide Wirkung überprüft werden.

30

Auch besteht die Möglichkeit, über Aufklärung der dreidimensionalen Struktur MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM mittels Röntgenstrukturanalyse weitere potentielle herbizide Wirkstoffe mittels "Molecular Modelling" zu detektieren. Die Herstellung von für die Röntgenstrukturanalyse benötigten Proteinkristallen sowie die entsprechenden Messungen und anschließenden Auswertungen dieser Messungen, die Detektion einer Bindungsstelle im Protein sowie die Vorhersage möglicher Inhibitorstrukturen sind dem Fachmann bekannt. Über "Molecular Modelling" ist prinzipiell auch eine Optimierung der über die oben genannten Verfahren identifizierten Verbindungen möglich.

35

40

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und ii) basiert, besteht darin, daß eine Testverbindung selektiert wird, welche die enzymatische Aktivität MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM verglichen wird.

Eine bevorzugte Ausführungsform des auf den Schritten i) und ii) basierenden Verfahrens besteht darin, dass

10

i. MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM in einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM enthält, kultiviert wird;

5

ii. MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und

20

iii. eine Verbindung selektiert wird, welche die Aktivität von MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM reduziert oder blockiert.

25

Hierbei kann im Schritt iii. zur Ermittlung der Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM verglichen werden.

30

Die MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM enthaltende Lösung kann aus dem Lysat des ursprünglichen Organismus bestehen. Alternativ kann die MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM enthaltende Lösung aus dem Lysat des transgenen, mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierten Organismus bestehen.

35

Falls erforderlich kann die MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM partiell oder vollständig über gängige Methoden aufgereinigt werden. Eine allgemeine Übersicht über gängige Techniken zur Reinigung von Proteinen sind beispielsweise in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994); ISBN 0-87969-309-6 beschrieben. Bei rekombinanter Darstellung kann eine Reinigung des mit einem Affinitäts-Tag fusionierten Proteins über nach dem Fachmann bekannten Affinitätschromatographie erfolgen.

40

Die für in vitro Verfahren benötigte MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM kann somit entweder mittels heterologer Expression aus einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus oder aus einem Organismus, der MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM

enthält, isoliert werden, zum Beispiel aus pflanzlichen Chloroplasten. (Anmerkung: Diese Aussage ist sehr stark verallgemeinert und bisher so wissenschaftlich eher widerlegt als bestätigt. Die MSM-Aktivität in Pflanzen ist sehr gering und auch in transgenen Überexpressionspflanzen nicht nachweisbar. Man misst immer nur die Akkumulation der Produkte (Tocopherol bzw Plastochinon). Insofern würde ich lieber schreiben

5 „... zum Beispiel aus Bakterien oder Hefen“)

Zur Identifizierung von herbiziden Verbindungen wird nun MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM mit einer Testverbindung inkubiert. Nach einer Reaktionszeit wird die enzymatische Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM mit der enzymatischen Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM ermittelt. Bei Inhibition der MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM beobachtet man eine signifikante Abnahme der Aktivität im Vergleich zur Aktivität des nicht inhibierten erfindungsgemäßen Polypeptides, wobei eine Ab-

10 nahme von mindestens 10%, vorteilhaft mindestens 20%, bevorzugt mindestens 30%, besonders bevorzugt um mindestens 50% bis hin zu einer 100% Reduktion (Blockierung) erzielt wird. Bevorzugt mindestens 50% Hemmung bei Konzentrationen der Testverbindung von  $10^{-4}$  M, bevorzugt bei  $10^{-5}$  M, besonders bevorzugt von  $10^{-6}$  M und ganz besonders bevorzugt von  $10^{-7}$  M bezogen auf Enzymkonzentration im mikromolaren Bereich. (Habe das hier entsprechend Seite 25 oben vereinheitlicht)

20

Die Bestimmung der Aktivität von MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM kann beispielsweise über einen Aktivitätstest erfolgen, in welchem die Zunahme des Produktes, die Abnahme des Substrates (oder Eduktes) bzw. die Ab- oder Zunahme des Cofaktors oder

25 über eine Kombination aus mindestens zwei der vorstehend genannten Parameter in Abhängigkeit einer definierten Zeitspanne bestimmt werden.

Die für den Aktivitätstest einzusetzenden Mengen an Substrat können zwischen 0.1-10 mM und Mengen an Cofaktor zwischen 0.1-10 mM bezogen auf 1-100 µg/ml MSM bzw. VMSM Enzym liegen.

30

Beispiele für geeignete Substrate für die Bestimmung der Aktivität der MSM oder VMSM sind z.B. 2-Methyl-6-Solanyl-Benzochinol, 2-Methyl-6-Phytyl-Benzochinol, 2-Methyl-6-Geranylgeranyl-Benzochinol sowie 2-Methyl-Benzochinol Derivate mit verkürzter Prenylkette in der 6-Position.

35

Beispiele für geeignete Cofaktoren ist S-Adenosylmethionin.

Gegebenenfalls können auch Derivate der vorstehend genannten Verbindungen verwendet werden, die eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope (z.B. [ $^{14}$ C-methyl]S-Adenosylmethionin) oder chemilumineszierende Markierung.

40

So kann die Bestimmung der Aktivität von MSM oder VMSM in Schritt iii) des oben genannten Verfahrens photometrisch nach Peddibhotla et al. (2003 Tetrahedron Letters 44, pp. 237-239) erfolgen.

5

Alternativ ist ein Nachweis der Reaktionsprodukte nach Auftrennung über HPLC möglich. Die Reaktionsprodukte lassen sich mittels radioaktiver photometrischer oder elektrochemischer Detektion nachweisen.

10

Ebenfalls möglich ist die photometrische Verfolgung der Reaktion auf Basis der charakteristischen chromophoren Eigenschaften der chinoiden Substrate und Produkte.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und iii) basiert, besteht aus den folgenden Schritten:

i. Herstellung eines transgenen Organismus enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierend für MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM, in welchem MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM überexprimiert wird

20

ii. Aufbringen einer Testverbindung auf den transgenen Organismus nach i) und auf einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps;

iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testverbindung; und

25

iv. Selektion von Testverbindungen, die ein vermindertes Wachstum oder eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken.

30

Hierbei beträgt der Wachstumsunterschied der in Schritt iv) zur Selektion eines Inhibitors mit herbizider Wirkung mindestens mehr als 10%, vorzugsweise mehr als 20%, bevorzugt mehr als 30%, besonders bevorzugt mehr als 40% und ganz besonders bevorzugt mehr als 50%.

35

Unter dem Begriff des transgenen Organismus sind die oben genannten erfindungsgemäßen transgenen Organismen zu verstehen.

40

Ein transgener Organismus, in welchem MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM überexprimiert wird, der für das oben genannte Verfahren geeignet ist, kann auch alternativ dadurch hergestellt werden, dass die Überexpression von MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM durch Manipulation der im Organismus natürlich vorhandenen Promotorsequenzen bewerkstelligt wird. Derartige Methoden sind dem Fachmann bekannt.

Der transgene Organismus ist hierbei vorzugsweise eine Pflanze, Alge, ein Cyanobakterium z.B. der Gattung *Synechocystes* oder ein Proteobakterium wie etwa *Magnetococcus* sp. MC1, bevorzugt Pflanzen, die sich mittels gängiger Techniken transformieren lassen, wie *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana Tabacum*, Cyanobakterien die sich leicht transformieren lassen, wie z.B. *Synechocystis*, in welchen die für ein erfindungsgemäße Polypeptid kodierende Sequenz über Transformation inkorporiert wurde. Diese transgenen Organismen weisen daher eine erhöhte Toleranz gegen Verbindungen auf, welche das erfindungsgemäße Polypeptid inhibieren. Hierbei können auch "knock-out"-Mutanten verwendet werden, bei denen das in diesem Organismus natürlich vorhandene analoge Gen(e) für MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM gezielt ausgeschaltet worden ist.

Die vorstehend genannte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann jedoch auch zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wirkung verwendet werden. Hierbei wird als transgener Organismus eine Pflanze eingesetzt. Das Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wirkung umfasst somit die folgenden Schritte:

i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM überexprimiert wird

ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;

iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und

iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transgenen Pflanze.

Hierbei werden in Schritt iv) Testverbindungen selektiert, die ein verändertes Wachstum des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken. Unter verändertem Wachstum ist hierbei eine Hemmung des vegetativen Wachstums der Pflanzen zu verstehen, was sich insbesondere in einer Reduzierung des Längenwachstums äußern kann. Die behandelten Pflanzen weisen demgemäß einen gedrungenen Wuchs auf; außerdem ist eine dunklere Blattfärbung zu beobachten. Weiterhin ist unter verändertem Wachstum auch eine zeitliche Veränderung des Reifeverlaufs, eine Hemmung oder Vermehrungen seitlicher Verzweigungen der Pflanzen, eine Verkürzung bzw. Verlängerung der Entwicklungsstadien, eine Erhöhung der Standfestigkeit, das Wachstum größerer Mengen an

## 31

Knospen, Blüten, Blättern, Früchten, Samenkörnern, Wurzeln und Knollen, eine Erhöhung des Zuckergehaltes in Pflanzen wie Zuckerrüben, Zuckerrohr sowie Zitrusfrüchten, des Proteingehaltes in Pflanzen wie Getreide oder Soja oder eine Stimulierung des Latexfluß an Gummibäumen zu verstehen. Die Detektion dieses veränderten Wachstums ist dem Fachmann bekannt.

Auch hier kann alternativ die transgene Pflanze, in welcher MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM durch Manipulation der in der Pflanze natürlich vorhandenen Promotorsequenzen bewerkstelligt wird. Derartige Methoden sind dem Fachmann bekannt.

10

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch mehrere Testverbindungen in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Wenn durch eine Gruppe von Testverbindungen eine Beeinflussung des Targets erfolgt, dann ist es entweder möglich, die einzelnen Testverbindungen direkt zu isolieren oder die Gruppe von Testver-

15

bindungen in verschiedene Untergruppen zu teilen, z.B. wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Zahl der verschiedenen Testverbindungen im erfindungsgemäßen Verfahren zu reduzieren. Das erfindungsgemäße Verfahren wiederholt man dann mit der einzelnen Testverbindung oder der entsprechenden Untergruppe von Testverbindungen. Abhängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Untergruppe nur noch eine geringe Anzahl von Testverbindungen oder nur noch eine Testverbindung umfaßt.

20

Alle oben beschriebenen Verfahren für die Identifizierung von Inhibitoren mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung werden im folgenden als "erfindungsgemäßes Verfahren" bezeichnet. Hierbei steht der "erfindungsgemäßes Verfahren" vorzugsweise für die oben beschriebenen Verfahren für die Identifizierung von Inhibitoren mit herbizider Wirkung.

25

Sämtliche, über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen können anschließend auf ihre herbizide oder wachstumsregulatorische Wirkung in vivo überprüft werden. Eine Möglichkeit zur Prüfung der Verbindungen auf herbizide Wirkung ist die Verwendung der Wasserlinse Lemna minor in Mikrotiterplatten. Als Parameter können Veränderungen des Chlorophyllgehalts und die Photosyntheseleistung gemessen werden. Es ist auch möglich, die Verbindung auf unerwünschte Pflanzen direkt zu applizieren, wobei die herbizide Wirkung z.B. über eingeschränktes Wachstum festgestellt werden kann.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch vorteilhaft in Hochdurchsatzverfahren, sog. HTS durchgeführt werden, welches das parallele Testen einer Vielzahl verschiedener Verbindungen ermöglicht.



Im HTS bietet sich für die praktische Durchführung die Verwendung von Trägern an, die eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, einen oder mehrere die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthaltenden Vektoren, einen oder mehrere transgene Organismen, welche mindestens eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten oder eines oder mehrere (Poly)peptide codiert über die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten. Der verwendete Träger kann fest oder flüssig sein, ist bevorzugt fest, besonders bevorzugt eine Mikrotiterplatte. Die vorstehend genannten Träger sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Gemäß der am weit verbreitesten Technik werden 96-well, 384-well und 1536 well Mikrotiterplatten verwendet, die in der Regel Volumina von bis zu 200  $\mu$ l umfassen können. Neben den Mikrotiterplatten sind die weiteren Bestandteile eines HTS-Systems passend zu den entsprechenden Mikrotiterplatten wie viele Instrumente, Materialien, automatische Pipettiervorrichtungen, Robotoren, automatisierte Plattenleser sowie Plattenwascher kommerziell erhältlich.

Neben den auf Mikrotiterplatten basierenden HTS-Verfahren können auch sogenannte "free format assays" oder Testsysteme, die zwischen den Proben keine physischen Barrieren aufweisen, verwendet werden wie z.B. in Jayaickreme et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 19 (1994) 161418; Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial Libraries, First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 710, 1995); Salmon et al., Molecular Diversity 2 (1996), 5763 und US 5,976,813.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert nach den erfindungsgemäßen Verfahren. Diese Verbindungen werden im folgenden "selektierte Verbindungen" genannt. Sie weisen ein Molekulargewicht von kleiner als 1000 g/mol, vorteilhaft kleiner 500 g/mol, bevorzugt kleiner 400 g/mol, besonders bevorzugt kleiner 300 g/mol. Verbindungen mit herbizider Wirkung weisen einem Ki-Wert kleiner 1 mM, bevorzugt kleiner 1  $\mu$ M, besonders bevorzugt kleiner 0,1  $\mu$ M ganz besonders bevorzugt kleiner 0,01  $\mu$ M aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung identifiziert nach den erfindungsgemäßen Verfahren. Auch diese Verbindungen werden im folgenden "selektierte Verbindungen" genannt. Der Begriff "selektierte Verbindungen" steht jedoch vorzugsweise für Verbindungen mit herbizider Wirkung.

Die selektierte Verbindungen können natürlich auch in Form ihrer landwirtschaftlich brauchbaren Salze vorliegen. Unter landwirtschaftlich brauchbaren Salzen kommen vor allem die Salze derjenigen Kationen oder die Säureadditionssalze derjenigen Säuren in Betracht, deren Kationen beziehungsweise Anionen die herbizide Wirkung der über die

erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen mit herbizider Wirkung nicht negativ beeinträchtigen.

5 Ferner können die selektierten Verbindungen sofern sie asymmetrisch substituierte  $\alpha$ -Kohlenstoffatome enthalten, entweder als Racemate, Enantiomerengemische, reine Enantiomere oder, sofern sie chirale Substituenten aufweisen, auch als Diastereomerengemische vorliegen.

10 Die selektierten Verbindungen können chemisch synthetisierte oder mikrobiologisch produzierte Stoffe sein und z.B. in Zellextrakten von z.B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden z.B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology the cell, 3rd Edition (1994), z.B. Kapitel 17. Die selektierte Verbindungen können auch aus umfangreichen Substanzbibliotheken stammen.

Mögliche Testverbindungen können Expressionsbibliotheken wie z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder ähnliches sein (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell 79 (1994), 193-198 und darin zitierte Referenzen).

Die selektierte Verbindungen können zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder als Wachstumsregulatoren verwendet werden. Herbizide Zusammensetzungen, welche die selektierten Verbindungen enthalten, bekämpfen Pflanzenwuchs auf Nichtkulturflächen sehr gut. In Kulturen wie Weizen, Reis, Mais, Soja und Baumwolle wirken sie gegen Unkräuter und Schadgräser, ohne die Kulturpflanzen nennenswert zu schädigen. Dieser Effekt tritt vor allem bei niedrigen Aufwandmengen auf. Die selektierten Verbindungen können zur Bekämpfung der oben bereits erwähnten Schadpflanzen verwendet werden.

35 In Abhängigkeit von der jeweiligen Applikationsmethode können selektierten Verbindungen bzw. diese enthaltende herbizide Zusammensetzungen vorteilhaft noch in einer weiteren Zahl von Kulturpflanzen zur Beseitigung unerwünschter Pflanzen eingesetzt werden. In Betracht kommen beispielsweise folgende Kulturen:

40 Allium cepa, Ananas comosus, Arachis hypogaea, Asparagus officinalis, Beta vulgaris spec. altissima, Beta vulgaris spec. rapa, Brassica napus var. napus, Brassica napus var. napobrassica, Brassica rapa var. silvestris, Camellia sinensis, Carthamus tinctorius, Carya illinoensis, Citrus limon, Citrus sinensis, Coffea arabica (Coffea canephora, Coffea liberica), Cucumis sativus, Cynodon dactylon, Daucus carota, Elaeis guineensis, Fragaria vesca, Glycine max, Gossypium hirsutum, (Gossypium arboreum, Gossy-

pium herbaceum, Gossypium vitifolium), Helianthus annuus, Hevea brasiliensis, Hordeum vulgare, Humulus lupulus, Ipomoea batatas, Juglans regia, Lens culinaris, Linum usitatissimum, Lycopersicon lycopersicum, Malus spec., Manihot esculenta, Medicago sativa, Musa spec., Nicotiana tabacum (N.rustica), Olea europaea, Oryza sativa, Phaseolus lunatus, Phaseolus vulgaris, Picea abies, Pinus spec., Pisum sativum, Prunus avium, Prunus persica, Pyrus communis, Ribes sylestre, Ricinus communis, Saccharum officinarum, Secale cereale, Solanum tuberosum, Sorghum bicolor (s. vulgare), Theobroma cacao, Trifolium pratense, Triticum aestivum, Triticum durum, Vicia faba, Vitis vinifera, Zea mays.

10

Darüber hinaus können die selektierten Verbindungen auch in Kulturen, die durch Züchtung einschließlich gentechnischer Methoden gegen die Wirkung von Herbiziden tolerant sind, verwandt werden. Die Herstellung dieser Kulturen wird weiter unten beschrieben.

Weiter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der oben bereits erwähnten herbiziden oder wachstumsregulatorischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass man selektierten Verbindungen mit geeigneten Hilfsmitteln zu Pflanzenschutzmitteln formuliert.

20

Die selektierten Verbindungen können z.B. in Form von direkt versprühbaren wässrigen Lösungen, Pulvern, Suspensionen, auch hochprozentigen wäßrigen, öligen oder sonstigen Suspensionen bzw. Suspoemulsionen oder Dispersionen, emulgierbaren Konzentraten, Emulsionen, Öldispersionen, Pasten, Stäubemitteln, Streumitteln oder Granulaten formuliert werden und durch Versprühen, Vernebeln, Verstäuben, Verstreuen oder Gießen angewendet werden. Die Anwendungsformen richten sich nach den Verwendungszwecken und der Natur der selektierten Verbindungen und sollte in jedem Fall möglichst die feinste Verteilung der selektierten Verbindungen gewährleisten. Die herbiziden Zusammensetzung enthalten eine herbizid wirksame Menge mindestens einer selektierten Verbindung und für die Formulierung von herbiziden Zusammensetzungen übliche Hilfsstoffe.

30

Zur Herstellung von Emulsionen, Pasten oder wässrigen oder ölhaltigen Formulierungen sowie dispergierbaren Konzentraten (DC) können die selektierten Verbindungen in einem Öl oder Lösungsmittel gelöst oder dispergiert werden, wobei weitere Formulierungshilfsstoffe zur Homogenisierung zugesetzt werden können. Es können aber auch aus selektierter Verbindung, gegebenenfalls Lösungsmitteln oder Öl sowie optional weiteren Hilfsmitteln bestehende flüssige oder feste Konzentrate hergestellt werden, die zur Verdünnung mit Wasser geeignet sind. Hier zu nennen sind emulgierbare Konzentrate (EC, EW), Suspensionen (SC), lösliche Konzentrate (SL), dispergierbaren Konzentrate (DC), Pasten, Pastillen netzbaren Pulvern oder Granulaten, wobei die festen Formulierungen entweder in Wasser löslich (soluble) oder dispergierbar (wet-

35

40

table) sein können. Desweiteren können entsprechende Pulver bzw. Granulate oder Tabletten noch mit einem festen, den Abrieb oder eine vorzeitige Wirkstofffreisetzung verhindernden Überzug ("coating") versehen werden.

- 5 Prinzipiell sind unter dem Begriff "Hilfsmittel" folgende Verbindungsklassen zu verstehen: Antischäumungsmittel, Verdicker, Netzmittel, Haftmittel, Dispergiermittel, Emulgiermittel, Bakterizide und/oder thixotrophe Agentien. Die Bedeutung der oben genannten Mittel ist dem Fachmann bekannt.

- 10 SLs, EWs und ECs können durch einfaches Mischen der entsprechenden Inhaltsstoffe hergestellt werden, Pulver über Mischen oder Vermahlen in speziellen Mühlentypen (z.Bsp. Hammermühlen). DC, SCs und SEs werden üblicherweise über Naßvermahlung ("wet milling") hergestellt, wobei ein SE aus einem SC durch Zugabe einer organischen Phase, die weitere Hilfsmittel oder selektierte Verbindungen enthalten kann,

hergestellt werden kann. Die Herstellung ist bekannt. Pulver-, Streu- und Stäubemittel können vorteilhaft durch Mischen oder gemeinsames Vermahlen der wirksamen Sub-

stanzen mit einem festen Trägerstoff hergestellt werden. Granulate, z.B. Umhüllungs-, Imprägnierungs- und Homogengranulate können durch Bindung der selektierten Ver-

bindungen an feste Trägerstoffe hergestellt werden. Weitere Details der Herstellung

sind dem Fachmann bekannt, und z.Bsp. in folgenden Schriften aufgeführt: US 3,060,084, EP-A 707445 (für flüssige Konzentrate), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, Dec. 4, 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4th Ed., McGraw-Hill, New York, 1963, pages 8-57 und ff. WO 91/13546, US 4,172,714, US 4,144,050, US 3,920,442, US 5,180,587, US 5,232,701, US 5,208,030,

25 GB 2,095,558, US 3,299,566, Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, Hance et al., Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 und Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Federal Republic of Germany), 2001.

- 30 Inerte flüssige und/oder feste Trägerstoffe geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. flüssige Zusatzstoffe wie Mineralölfraktionen von mittlerem bis hohem Siedepunkt, wie Kerosin oder Dieselöl, ferner Kohlenteeröle sowie Öle pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, aliphatische, cyclische und aromatische Kohlenwasserstoffe, z.B. Paraffin, Tetrahydronaphthalin, 35 alkylierte Naphthaline oder deren Derivate, alkylierte Benzole oder deren Derivate, Alkohole wie Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Cyclohexanol, Ketone wie Cyclohexanon oder stark polare Lösungsmittel, z.B. Amine wie N-Methylpyrrolidon oder Wasser.

- 40 Feste Trägerstoffe sind beispielsweise Mineralerden wie Kieselsäuren, Kieselgele, Silikate, Talkum, Kaolin, Kalkstein, Kalk, Kreide, Bolus, Löß, Ton, Dolomit, Diatomeenerde, Calcium- und Magnesiumsulfat, Magnesiumoxid, gemahlene Kunststoffe, Dünge-

mittel, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumnitrat, Harnstoffe und pflanzliche Produkte wie Getreidemehl, Baumrinden-, Holz- und Nußschalenmehl, Cellulosepulver oder andere feste Trägerstoffe.

- 5 Oberflächenaktive Stoffe (Tenside) geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. Alkali-, Erdalkali-, Ammoniumsalze von aromatischen Sulfonsäuren, z.B. Lignin-, Phenol-, Naphthalin- und Di-  
butylnaphthalinsulfonsäure, sowie von Fettsäuren, Alkyl- und Alkylarylsulfonaten, Alkyl-,  
10 Laurylether- und Fettalkoholsulfaten, sowie Salze sulfatierter Hexa-, Hepta- und Octadecanolen sowie von Fettalkoholglykoether, Kondensationsprodukte von sulfoniertem Naphthalin und seiner Derivate mit Formaldehyd, Kondensationsprodukte des Naphthalins bzw. der Naphthalinsulfonsäuren mit Phenol und Formaldehyd, Polyoxyethylenoctylphenolether, ethoxyliertes Isooctyl-, Octyl- oder Nonylphenol, Alkylphenyl-,  
Tributylphenylpolyglykoether, Alkylarylpolyetheralkohole, Isotridecylalkohol, Fettalkoholethylenoxid-Kondensate, ethoxyliertes Rizinusöl, Polyoxyethylenalkylether oder Polyoxypropylenalkylether, Laurylalkoholpolyglykoetheracetat, Sorbitester, Lignin-Sulfitablaugen oder Methylcellulose.

- Die Applikation der herbiziden Zusammensetzungen bzw. der selektierten Verbindungen kann im Vorauf- oder im Nachaufverfahren erfolgen. Sind die selektierten Verbindungen für gewisse Kulturpflanzen weniger verträglich, so können Ausbringungstechniken angewandt werden, bei welchen die selektierten Verbindungen mit Hilfe der Spritzgeräte so gespritzt werden, daß die Blätter der empfindlichen Kulturpflanzen nach Möglichkeit nicht getroffen werden, während die selektierten Verbindungen auf die Blätter darunter wachsender unerwünschter Pflanzen oder die unbedeckte Bodenfläche gelangen (post-directed, lay-by).

- 25 Die Aufwandmengen an selektierten Verbindungen betragen je nach Bekämpfungsziel, Jahreszeit, Zielpflanzen und Wachstumsstadium 0.001 bis 3.0, vorzugsweise 0.01 bis 30 1.0 kg/ha.

- Die Bereitstellung des herbiziden Targets ermöglicht weiterhin ein Verfahren zur Identifizierung einer MSM oder VMSM, welche nicht oder nur eingeschränkt durch ein Herbizid, welches als Wirkort die MSM hat z.B. die herbizid wirkenden selektierten Verbindungen, gehemmt wird. Im folgenden wird ein sich derart von der MSM oder VMSM, bevorzugt VMSM unterscheidendes Protein als MSM-Variante bezeichnet, die vorzugsweise durch eine Nukleinsäuresequenz codiert wird, welche

- 35 i) ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten läßt; oder
- 40

## 37

- ii) ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten läßt, und um mindestens 20 Aminosäuren am C-terminus und um mindestens 20 Aminosäuren am N-terminus verkürzt ist;

umfasst.

- Funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:3 werden durch eine Aminosäuresequenz kodiert, welche eine Identität mit der SEQ ID No:4 von mindestens 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65% oder 66% vorzugsweise mindestens 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72% oder 73% vorzugsweise mindestens 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% oder 80% bevorzugt mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92% oder 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% aufweist.

Sämtliche oben genannten Nukleinsäuresequenzen stammen vorzugsweise aus einer Pflanze.

In einer bevorzugten Ausführungsform besteht das oben genannte Verfahren zur Erzeugung von Nukleinsäuresequenzen codierend für MSM-Varianten von Nukleinsäuresequenzen umfassen aus folgenden Schritten:

- a) Expression der von den oben genannten Nukleinsäuren kodierten Proteine in einem heterologen System oder in einem zellfreien System;
- b) Randomisierte oder gerichtete Mutagenese des Proteins durch Modifikation der Nukleinsäure;
- c) Messung der Interaktion des veränderten Genprodukts mit dem Herbizid;
- d) Identifizierung von Derivaten des Proteins die eine geringere Interaktion aufweisen;
- e) Testung der biologischen Aktivität des Proteins nach Applikation des Herbizides;
- f) Auswahl der Nukleinsäuresequenzen, die eine veränderte biologische Aktivität gegenüber dem Herbizid aufweisen.

Die nach dem oben beschriebenen Verfahren nach ausgewählten Sequenzen werden vorteilhaft in einen Organismus eingebracht. Deshalb ist ein weiterer Erfindungsge-

genstand ein nach diesem Verfahren hergestellter Organismus. Bevorzugt ist der Organismus eine Pflanze, besonders bevorzugt eine der oben definierten Kulturpflanzen.

- 5      Anschließend erfolgt die Regeneration ganzer Pflanzen und Überprüfung der Resistenz gegenüber der selektierten Verbindung in intakten Pflanzen.

10      Veränderte Proteine und/oder Nukleinsäuren, die in Pflanzen Resistenz gegen die selektierten Verbindungen vermitteln können, können aus den oben genannten Nukleinsäuresequenzen auch über die sogenannte "site directed mutagenesis" hergestellt werden, durch diese Mutagenese kann beispielsweise die Stabilität und/oder Aktivität des Target Proteins oder die Eigenschaften wie Bindung und Wirkung der oben genannten erfindungsgemäßen Inhibitoren sehr gezielt verbessern bzw. verändert werden.

- 15      Beispielsweise wurde von Zhu et al. (Nature Biotech., Vol. 18, May 2000: 555-558) eine "site directed mutagenesis"-Methode in Pflanzen beschrieben, die vorteilhaft verwendet werden kann.

20      Weiterhin können Veränderungen über die von Spee et al. (Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 3, 1993: 777-78) beschriebenen PCR-Methode unter Verwendung von dITP zur zufälligen Mutagenese erzielt werden oder durch die von Rellos et al. (Protein Expr. Purif., 5, 1994: 270-277) weiter verbesserte Methode.

- 25      Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung dieser veränderten Proteine und/oder von Nukleinsäuren ist eine von Stemmer et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 1994: 10747-10751) beschriebene "in vitro" Rekombinationstechnik für die molekulare Evolution oder die von Moore et al. (Nature Biotechnology Vol. 14, 1996: 458-467) beschriebene Kombination der PCR- und Rekombinationsmethode.

30      Ein weiterer Weg zur Mutagenese von Proteinen wird von Greener et al. in Methods in Molecular Biology (Vol. 57, 1996: 375-385) beschrieben. In EP-A-0 909 821 wird eine Methode zur Veränderung von Proteinen unter Verwendung des Mikroorganismus E. coli XL-1 Red beschrieben. Dieser Mikroorganismus erzeugt bei der Replikation Mutationen in den eingeführten Nukleinsäuren und führt so zu einer Veränderung der genetischen Information. Über Isolierung der veränderten Nukleinsäuren bzw. der veränderten Proteine und Testung auf Resistenz lassen sich leicht vorteilhafte Nukleinsäuren und die durch sie kodierten Proteine identifizieren. Diese können dann nach Einbringen in Pflanzen dort die Resistenz ausprägen und so zur Resistenz gegen die Herbizide führen.

40

Weitere Methoden der Mutagenese und Selektion sind beispielsweise Methoden wie die in vivo Mutagenese von Samen oder Pollen und Selektion resistenter Allele in An-

wesenheit der erfindungsgemäßen Inhibitoren, gefolgt von genetischer und molekularer Identifizierung des veränderten, resistenten Allels. Weiterhin die Mutagenese und Selektion von Resistenzen in der Zellkultur durch Vermehrung der Kultur in Anwesenheit von sukzessiv steigenden Konzentrationen der erfindungsgemäßen Inhibitoren.

- 5 Dabei kann die Erhöhung der spontanen Mutationsrate durch chemische/physikalische mutagene Behandlung ausgenutzt werden. Wie vorgehend beschrieben lassen sich auch mit Mikroorganismen, die eine endogene oder rekombinante Aktivität der durch die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren codierten Proteine haben, und die gegenüber den erfindungsgemäß identifizierten In-
- 10 hibitoren sensitiv sind, veränderte Gene isolieren. Die Anzucht der Mikroorganismen auf Medien mit steigenden Konzentration von erfindungsgemäßen Inhibitoren erlaubt die Selektion und Evolution von resistenten Varianten der erfindungsgemäßen Targets. Die Frequenz der Mutationen kann wiederum durch mutagene Behandlungen erhöht werden.

Daneben stehen Verfahren zur gezielten Veränderungen von Nukleinsäuren zur Verfügung (Zhu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96, 8768 - 8773 und Beethem et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96, 8774 - 8778). Diese Methoden ermöglichen es, in den Proteinen solche Aminosäuren, die für die Bindung von Inhibitoren von Bedeutung

20 sind, durch funktionell analoge Aminosäuren zu ersetzen, die jedoch die Bindung des Inhibitors verhindern.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist deshalb ein Verfahren zur Erstellung von Nukleinsäuresequenzen, welche für Genprodukte kodieren, die eine veränderte biologische

25 Aktivität aufweisen, wobei die biologische Aktivität dahingegen verändert wurde, daß eine erhöhte Aktivität vorliegt. Unter erhöhter Aktivität ist eine gegenüber dem Ausgangsorganismus bzw. gegenüber dem Ausgangsgenprodukt um mindestens 10%, bevorzugt um mindestens 30%, besonders bevorzugt um mindestens 50%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 100% höhere Aktivität zu verstehen. Weiterhin kann

30 die biologische Aktivität dahingegen verändert worden sein, daß die erfindungsgemäßen Substanzen und/oder Mittel nicht mehr oder nicht mehr richtig an die Nukleinsäuresequenzen und/oder die durch sie kodierten Genprodukte binden. Unter nicht mehr oder nicht mehr richtig ist im Sinne der Erfindung zu verstehen, daß die Substanzen um mindestens 30%, bevorzugt mindestens 50%, besonders bevorzugt um mindestens

35 70%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 80% oder gar nicht mehr an die veränderten Nukleinsäuren und/oder Genprodukte im Vergleich zum Ausgangsgenprodukt oder den Ausgangsnukleinsäuren binden.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft deshalb eine transgene Pflanze, welche

40 mit einer Nukleinsäuresequenz, welche für ein Genprodukt kodiert, das eine veränderte biologische Aktivität aufweist, oder mit einer Nukleinsäuresequenz codierend für eine



MSM oder VMSM -Variante transformiert wurde. Verfahren zur Transformation sind dem Fachmann bekannt und beispielhaft weiter oben ausgeführt.

Genetisch veränderten transgene Pflanzen, die gegen die nach den erfindungsgemäßen Verfahren gefundenen Substanzen und/oder Mittel enthaltend diese Substanzen resistent sind, können auch durch Transformation gefolgt von Überexpression einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz erzeugt werden. Deshalb ist ein weiterer Erfindungsgegenstand ein Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen, die gegen Substanzen, die nach einem erfindungsgemäßen Verfahren gefunden wurden, resistent sind, dadurch gekennzeichnet, daß in diesen Pflanzen erfindungsgemäße Nukleinsäuren codierend für eine MSM oder VMSM überexprimiert werden. Ein ähnliches Verfahren wird beispielhaft in Lermantova et al., Plant Physiol., 122, 2000: 75 - 83 beschrieben.

Die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung resistenter Pflanzen ermöglichen die Entwicklung neuer Herbizide, die eine möglichst umfassende Pflanzenspezies unabhängige Wirkung aufweisen (sog. Totalherbizide), in Kombination mit der Entwicklung von gegenüber dem Totalherbizid resistenten Nutzpflanzen. Gegenüber Totalherbiziden resistente Nutzpflanzen sind bereits verschiedentlich beschrieben worden. Dabei können mehrere Prinzipien zur Erzielung einer Resistenz unterschieden werden:

- a) Resistenzzeugung in einer Pflanze über Mutationsverfahren oder gentechnische Verfahren, indem das als Zielort für das Herbizid dienende Protein deutlich überproduziert wird und indem auf Grund des großen Überschusses des als Zielort für das Herbizid dienende Protein, die von diesem Protein in der Zelle ausgeübte Funktion auch nach Applikation des Herbizides beibehalten wird.
- b) Veränderung der Pflanze dahingehend, daß eine modifizierte Version des als Zielort des Herbizid fungierenden Proteins eingeführt wird und daß das neu eingeführte modifizierte Protein vom Herbizid nicht in seiner Funktion beeinträchtigt wird.
- c) Veränderung der Pflanze dahingehend, daß ein neues Protein/ eine neue RNA eingeführt wird welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die für die herbizide Wirkung der niedermolekularen Substanz verantwortliche chemische Struktur des Proteins oder der Nukleinsäure wie der RNA oder der DNA so verändert wird, daß durch die veränderte Struktur keine herbizide Wirkung mehr entfaltet werden kann, daß heißt die Interaktion des Herbizids mit dem Zielort nicht mehr erfolgen kann.

- d) das die Funktion des Targets durch ein neues in die Pflanze eingebrachtes Gen ersetzt wird, und so ein sogenannter "alternativer Pathway" geschaffen wird.
- e) Das die Funktion des Targets durch ein anderes in der Pflanze vorhandenes Gen bzw. dessen Genprodukt übernommen wird.

Dem Fachmann sind alternative Verfahren zur Identifizierung von den homologen Nukleinsäuren beispielsweise in anderen Pflanzen mit ähnlichen Sequenzen wie beispielsweise unter Verwendung von Transposons, bekannt. Gegenstand dieser Erfindung ist daher auch die Verwendung von alternativen Insertionsmutageneseverfahren zur Insertion von fremder Nukleinsäuren in die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in anderen Pflanzen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt mit einer der oben beschriebenen Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Expressionskassette nach ebenfalls oben beschriebenen gängigen Transformationsmethoden.

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten MSM-Variante kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung oder durch einen Keimungstest ermittelt werden.

Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des MSM Gens und deren Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hemmstoffen der MSM oder VMSM an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden sollten.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden sollten.

#### Allgemeine DNA-Manipulations- und Klonierungsverfahren

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) und Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994); ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.

Pflanzenmolekularbiologische Standardverfahren sowie Pflanzentransformationsverfahren sind beschrieben in Schultz et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers (1998), Reither et al., Methods in Arabidopsis Research, World Scientific Press (1992) und Arabidopsis: A Laboratory Manual (2001), ISBN 0-87969-573-0.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (E. coli DH5a, XL-1 blue, BL21DE(3)) wurden von Stratagene, BRL Gibco oder Invitrogen, Carlsberg, CA bezogen. Zur Klonierung wurden die Vektoren pCR T7CT TOPO, pCR T7/NT TOPO und pCR 2.1 TOPO der Firma Invitrogen und pUC 19 der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg) und der Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66, 1990, 221-230) verwendet.

#### Beispiel 1: Erzeugung einer cDNA-Bibliothek im Pflanzentransformationsvektor

Zur Erzeugung einer cDNA-Bibliothek (im folgenden "binäre cDNA-Bank" genannt) in einem Vektor, der direkt für die Transformation von Pflanzen verwendet werden kann, wurde mRNA aus verschiedenen Pflanzengeweben isoliert und mit dem TimeSaver cDNA-Synthese Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Erststrangsynthese wurde mit T<sub>12-18</sub> Oligonucleotiden nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Größenfraktionierung und Ligation von EcoRI-NotI-Adaptoren nach Herstellerangaben und Auffüllen der Überhänge mit Pfu DNA Polymerase (Stratagene) wurde die cDNA-Population normalisiert. Hierzu wurde die Methode nach Kohci et al, 1995, Plant Journal 8, 771-776 vorgegangen, wobei die cDNA durch PCR mit dem Oligonukleotid N1 unter den in Tabelle 1 aufgeführten Bedingungen amplifiziert wurde.

Tabelle 1

Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklennummer
94	300	1
94	8	10
52	60	
72	180	
94	8	10
50	60	
72	180	
94	8	10
48	60	
72	180	
72	420	1

Das erhaltene PCR-Produkt wurde an die Säulenmatrix des PCR-Purification Kits (Qiagen, Hilden) gebunden und mit 300 mM NaP-Puffer, pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 0.04% SDS eluiert. Die DNA wurde 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend 24 Stunden bei 60°C renaturiert. 50 µl der DNA wurden auf eine Hydroxylapatitsäule aufgetragen und diese 3 Mal mit 1 ml 10 mM NaP-Puffer, pH 6.8 gewaschen. Die gebundene Einzelstrang-DNA wurde mit 130 mM NaP-Puffer, pH 6.8 eluiert, mit Ethanol gefällt und in 40 µl Wasser gelöst. Hiervon wurden 20 µl für eine weitere PCR-Amplifikation wie oben beschrieben verwendet. Nach einer weiteren Anreicherung von ssDNA wurde eine dritte PCR-Amplifikation wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Herstellung des Pflanzentransformationsvektors zur Aufnahme der wie oben beschriebenen hergestellten cDNA-Population erfolgte über Restriktionsenzym-Verdau des Vektor pUC18 mit SbfI und BamHI, Reinigung des Vektorfragment gefolgt von Auffüllen der Überhänge mit Pfu DNA Polymerase und Religation mit T4 DNA Ligase (Stratagene). Das so hergestellte Konstrukt wird im folgenden als pUC18SbfI- bezeichnet.

Der Vektor pBinAR wurde zunächst mit NotI gespalten, nach Auffüllen der Enden religiert, mit SbfI gespalten, nach Auffüllen der Enden religiert und im Anschluß mit EcoRI und HindIII gespalten. Das resultierende Fragment wurde in ein Derivat des binären Pflanzentransformationsvektors pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) Plant Mol Biol 25:989-994) ligiert, der eine Transformation von Pflanzen mittels Agrobakterium ermöglicht und eine Kanamycinresistenz in transgenen Pflanzen vermittelt, ligiert. Das hierbei erzeugte Konstrukt wird im folgenden als pSun12/35S bezeichnet.

pUC18SbfI- wurde als Template für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit den Oligonucleotiden V1 und V2 (siehe Tabelle 2) und Pfu DNA Polymerase eingesetzt. Das resultierende Fragment wurde in den mit SmaI gespalten pSun12/35S ligiert, wodurch pSunblues2 erzeugt wurde. Nach Spaltung mit NotI, Dephosphorylierung mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) und Aufreinigung des Vektorfragmentes wurde pSunblues2 mit der normalisierten und ebenfalls mit NotI gespaltenen cDNA Population ligiert. Nach Transformation in E.coli XI-1blue (Stratagene) wurden die so erzeugte Klone in Mikrotiterplatten abgelegt. Die binäre cDNA-Bank enthält cDNAs in "Sense"- und in "Antisense"-Orientierung unter Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus 35s Promotors, die dementsprechend nach der Transformation in Tabakpflanzen zu "Cosuppressions"- und "Antisense"-Effekten führen können.

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Nukleinsäuresequenz
N1	5'-AGAATTCGCGCCGCT-3' (SEQ ID NO:11)

V1 (PWL93not)	5'-CTCATGCGGCCGCGCGCAACGCAATTAATGTG-3' (SEQ ID NO:12)
V2 (pWL92)	5'-TCATGCGGCCGCGAGATCCAGTTCGATGTAAC-3' (SEQ ID NO:13)
G1 (35S)	5'-GTGGATTGATGTGATATCTCC-3' (SEQ ID NO:14)
G2 (OCS)	5'-GTAAGGATCTGAGCTACACAT-3' (SEQ ID NO:15)

### Beispiel 2: Transformation und Analyse von Tabakpflanzen

Ausgewählte Klone der binären cDNA-Bank wurden in *Agrobacterium tumefaciens*

- 5 C58C1:pGV2260 transformiert (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13(1984), 4777-4788) und unter Streptomycin/Spectinomycin-Selektion inkubiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) mit dem binären Klon NT006075002r wurde eine in YEB-Medium auf OD600 = 0.8-1.6 verdünnte Übermalkultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie benutzt. Blattscheiben steriler
- 10 Pflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petrischale mit der Agrobakterienverdün-  
nung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei  
25°C auf Murashige-Skoog Medium (Physiol. Plant. 15(1962), 473) mit 2% Saccharose  
(2MS-Medium) mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16  
Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf  
15 MS-Medium mit 500mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50mg/l Kanamycin, 1mg/l  
Benzylaminopurin (BAP), 0,2mg/l Naphtyleessigsäure und 1,6g/l Glukose weitergeführt.  
Wachsende Sprossen wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan  
und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Regenerierte Sprossen wurden auf 2MS-Medium mit  
Kanamycin und Claforan erhalten. Auf diese Weise wurden transgene Pflanzen der  
20 Linie E\_0000018240 erzeugt.

Nach Transfer der Sprosse in Erde wurden die Pflanzen für 1-20 Wochen im Ge-  
wächshaus auf die Ausprägung von Phänotypen beobachtet. Dabei stellte sich heraus,  
dass transgene Pflanzen der Linie E\_0000018240 ähnliche Phänotypen aufwiesen.

- 25 Diese Pflanzen bleiben im Wachstum stark hinter Vergleichspflanzen zurück, weisen  
ausgeprägte Blattchlorosen und -nekrosen auf und sterben zum Teil innerhalb weniger  
Tage.

Die Integration der cDNA der Klone in das Genom der transgenen Linien wurde über  
30 PCR mit den Oligonukleotiden G1 und G2 (siehe Tabelle 1 im Beispiel 1) und genom-  
ischer DNA der entsprechenden transgenen Linien nachgewiesen. Hierzu wurde vor-  
zugsweise TAKARA Taq-DNA Polymerase nach Herstellerangaben (MoBiTec, Göttin-  
gen) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der jeweils zur Transformation verwendete  
cDNA-Klon der binären cDNA-Bank als Template für eine PCR-Reaktion. PCR Produk-  
35 te identischer Größe oder ggf. gleicher Spaltungsmuster, die nach Spaltung mit ver-  
schiedenen Restriktionsenzymen erhalten wurden, dienten als Nachweis der Integrati-

on der entsprechenden cDNA. Das Insert des Klonen NT006075002r wurde auf diese Weise in den transgenen Pflanzen mit den oben genannten Phänotypen nachgewiesen.

#### 5 Beispiel 3 Sequenzanalyse des Klone

Das cDNA-Insert des Klons NT006075002r, dessen Transformation in Tabakpflanzen zu den oben genannten Phänotypen führte wurde sequenziert.

- 10 Die cDNA von NT006075002r (SEQ ID NO:9) weist eine Länge von 910 bp auf und enthält ein offenes Leseraster von 600 bp, welches für ein Polypeptid von 200 Aminosäuren (SEQ ID NO:10) codiert. Über SEQ ID NO: 9 konnte der korrespondierende Vollängenklon identifiziert werden (SEQ ID NO:1; Genbank Acc. Nr. X94968).

- 5 SEQ ID NO: 1 weist darüber hinaus signifikante Identität zu „apg1“ aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO:3), so dass von einer gleichen Funktion der codierten Proteine ausgegangen werden kann.

- NT006075002r ist somit ein partieller cDNA-Klon der für den C-terminalen Teil eines  
20 Enzyms aus Tabak codiert, dass homolog zu 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* ist.

- Hiermit wurde erstmalig und überraschend gezeigt, dass 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase essentiell für Pflanzen ist und das bereits eine  
25 gering verringerte Expression zu den oben genannten Schädigungen führt.

#### Beispiel 4: Expression in E.coli

- 30 Zum Nachweis der MSBQ-MT-Enzymaktivität des von SEQ ID NO:1 codierten Enzyms sowie zur Erzeugung von ausreichender 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase Enzymaktivität für HTS-Anwendungen wurden Fragmente der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase cDNAs von SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO: 3 mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und Expressionsvektoren kloniert. Hierzu wurden cDNAs und cDNA-Bibliotheken von *Nicotiana tabacum* bzw.  
35 *Arabidopsis thaliana* als Template für PCR mit Pfu bzw. Pfu-ultra Polymerase (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) eingesetzt. Tabelle 1 gibt Auskunft über die verwendeten Oligonukleotide und die damit erzeugten Fragmente. Die erhaltenen cDNA-Fragmente wurden in pCRT7/CT TOPO TA Vektoren kloniert (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und zur Überprüfung auf gewünschte Sequenzidentität sequenziert. Die erhaltenen Expressionsplasmide wurden in E.coli BL-21(DE3)RIL (Stratagene) Stämme transformiert. Die transformierten Stämme wurden über Nacht unter Schütteln in flüssigem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 50µg/ml Chloramphenicol bei 37°C

kultiviert. Großvolumige Tageskulturen wurden auf OD600 = 0,1 angeimpft und kultiviert, bis eine OD600 von 0,4-0,7 erreicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Kulturen wurden weitere 2,5 Stunden kultiviert. Die Analyse von Zellextrakten der Expressionskulturen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte, dass insbesondere die 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase in voller Länge nur in geringer Menge exprimiert werden kann, jedoch die N- und C-terminal verkürzten Formen in deutlich höherer Menge exprimiert wurden. Besonders vorteilhaft ist die Abspaltung der C-terminal vorhergesagten Transmembran-Domänen.

10

Über die fusionierten His-tags ist eine Aufreinigung über Metallchelate-Matrices, wie z.B. Hi-Trap-Säulen (Pharmacia, Uppsala, Schweden) möglich.

	Primer		C-terminus	N-Terminus
No	5' (N-terminal)	3' (C-terminal)		***
K1*	ATGGCCTCTTT- GATGCTCAACG (SEQ ID NO:16)	GATGGGTTGGTCTTTGG GAACG (SEQ ID NO:17)	+His-Tag	Volle Länge
K2*	CCTCTTCTCAACTTGGT GGATC (SEQ ID NO:18)	GGGGTTTACAATGATA- CAATGATC (SEQ ID NO:19)	-His-Tag	Volle Länge
K3*	ATGAGCAG- CAGCGTGTCG (SEQ ID NO:20)	GCGTCCCAAGAAGGA- GAAGG (SEQ ID NO:21)	-31 AS +His-Tag	-51 AS
K4*	ATGTGCAGCAGCAG- CAGC (SEQ ID NO:22)	GCGTCCCAAGAAGGA- GAAGG (SEQ ID NO:23)	-31 AS +His-Tag	-49 AS
K5*	ATGTGCAGCAGCAG- CAGC (SEQ ID NO:24)	TCAGCGTCCCAAGAAG- GAG (SEQ ID NO:25)	-31 AS	-49 AS
K6*	ATGAGCAG- CAGCGTGTCG (SEQ ID NO:26)	TCA- GATGGGTTGGTCTTTGG (SEQ ID NO:27)	Volle Länge	(-51 AS) ab Serin
K7*	ATGAGCAG- CAGCGTGTCG (SEQ ID NO:28)	GATGGGTTGGTCTTTGG GA (SEQ ID NO:29)	Volle Länge +His-Tag	(-51 AS) ab Serin
K8*	ATGTGCAGCAGCAG- CAGC (SEQ ID NO:30)	GATGGGTTGGTCTTTGG GA (SEQ ID NO:31)	Volle Länge +His-Tag	-49 AS
K9*	ATGAGCAG- CAGCGTGTCG (SEQ ID NO:32)	TCAGCGTCCCAAGAAG- GAG (SEQ ID NO:33)	-31 AS	(-51 AS) ab Serin
K10	ATGTGCAGCAGCAG-	GAAGGATCA-	Volle Länge	-49 AS

47

**	CAGC (SEQ ID NO:34)	GATGGGTTGGTC (SEQ ID NO:35)		
----	---------------------	-----------------------------	--	--

\*) Template: cDNA Bibliothek aus Arabidopsis

\*\*) Template cDNA Bibliothek aus Nicotiana tabaccum

\*\*\*) AS = Aminosäure

5

#### Beispiel 5: in vitro Testsysteme

10

2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase -Aktivität von in E. coli exprimierter und ggf. aufgereinigter 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase aus Beispiel 4 kann unter Verwendung von radioaktiv markiertem S-Adenosylmethionin und Nachweis über Dünnschicht-Chromatographie wie beschrieben gemessen werden (analog Peddibhotla et al. 2003 Tetrahedron Letters 44, pp. 237-239), wobei folgende Substrate eingesetzt werden können: 2-Methyl-6-Solanyl-Benzochinol, 2-Methyl-6-Phytyl-Benzochinol, 2-Methyl-6-Geranylgeranyl-Benzochinol sowie 2-Methyl-Benzochinol Derivate mit verkürzter Prenylkette in der 6-Position.

15



## Patentansprüche

1. Verwendung von 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase in einem Verfahren zur Identifizierung von Herbiziden.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase von einer Nukleinsäuresequenz kodiert wird, umfassend

- i) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 oder in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- ii) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 oder in SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder
- iii) ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten lässt.

3. Verwendung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuresequenz der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase, welche von einer Nukleinsäuresequenz kodiert wird, umfassend

- i) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 oder in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- ii) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 oder in SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder
- iii) ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das
- iv) sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten lässt;

um mindestens 20 Aminosäuren am C-terminus und um mindestens 20 Aminosäuren am N-terminus verkürzt ist.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuresequenz der verkürzten 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, enthaltend

## 2

i) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:5 oder in SEQ ID NO:7 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

5 ii) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:6 oder in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt.

10 5. Nukleinsäuresequenzen kodierend für ein Polypeptid mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase umfassend

i) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:5 oder in SEQ ID NO:7 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

5 ii) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:6 oder in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder

20 iii) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten lässt, und um mindestens 20 Aminosäuren am C-terminus und um mindestens 20 Aminosäuren am N-terminus verkürzt ist.

25 6. Polypeptid mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase kodiert von einem Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5.

30 6. Expressionskassette umfassend

a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 5; oder

b) zusätzliche Funktionselemente; oder

35 c) eine Kombination aus a) und b).

8. Vektor umfassend eine Expressionskassette nach Anspruch 7.

40 9. Nicht humaner, transgener Organismus umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 5, eine Expressionskassette gemäß Anspruch 7 oder einen Vektor gemäß Anspruch 8 ausgewählt aus Bakterien, Hefen, Pilzen, tierischen oder pflanzlichen Zellen.

10. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung umfassend die folgenden Schritte:

5 i. Inkontaktbringen eines Polypeptid mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen, welche die Bindung der Testverbindung(en) an das Polypeptid mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase erlauben; und

10

ii. Nachweis, ob die Testverbindung an das Polypeptid mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase bindet; oder

5

iii. Nachweis, ob die Testverbindung die Aktivität des Polypeptides mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase aus i) reduziert oder blockiert; oder

iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression des Polypeptides mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase aus i) reduziert oder blockiert.

20

11. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid mit der Aktivität einer 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, umfassend

25

i) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:5 oder in SEQ ID NO:7 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

30

ii) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:6 oder in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder

35

iii) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten lässt, und um mindestens 20 Aminosäuren am C-terminus und um mindestens 20 Aminosäuren am N-terminus verkürzt ist.

40

12. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuresequenz der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase, welche von einer Nukleinsäuresequenz kodiert wird, umfassend

- 5
- 10
- i) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 oder in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
  - ii) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 oder in SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder
  - iii) ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten lässt;

um mindestens 20 Aminosäuren am C-terminus und um mindestens 20 Aminosäuren am N-terminus verkürzt ist.

5

13. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass die 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase von einer Nukleinsäuresequenz kodiert wird, umfassend

- 20
- 25
- i) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:5 oder in SEQ ID NO:7 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
  - ii) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:6 oder in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt.

30

14. Verfahren nach Anspruch 10, 11, 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass eine Testverbindung selektiert wird, welche die Aktivität der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase reduziert oder blockiert.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass

- 35
- 40
- i. 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase entweder in einem transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase enthält, kultiviert wird;
  - ii. 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und

- iii. eine Testverbindung selektiert wird, welche die Aktivität der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase aus Schritt ii) reduziert oder blockiert.

5 16. Verfahren nach Anspruch 14 dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Schritte umfasst:

- 10 i. Herstellung eines transgenen Organismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz codierend für 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase, in welchem 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase überexprimiert wird;
- 5 ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf den transgenen Organismus nach i) und auf einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps; und
- 15 iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testsubstanz; und
- 20 iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein vermindertes Wachstum oder eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus.

25 17. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Schritte umfasst:

- 30 i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase, in welcher 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase wird;
- ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;
- 35 iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und
- 40 iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transgenen Pflanze.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Substanzen in einem High-Throughput-Screening durchgeführt wird.

5 19. Träger, der eines oder mehrere der Nukleinsäuremoleküle nach Anspruch 5, oder eine oder mehrere Expressionskassetten nach Anspruch 7, einen oder mehrere Vektoren nach Anspruch 8, einen oder mehrere Organismen nach Anspruch 9 oder eines oder mehrere (Poly)peptide nach Anspruch 6 aufweist.

10 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Substanzen in einem High-Throughput-Screening durchgeführt wird unter Verwendung eines Trägers gemäß Anspruch 19.

21. Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert über eines der Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16, 18 und 20.

22. Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung identifiziert über das Verfahren nach Anspruch 17, 18 oder 20.

20 23. Verfahren zur Herstellung einer agrochemischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man

25 a) eine Verbindung mit herbizider Wirkung nach Anspruch 21 oder eine Verbindung mit wachstumsregulatorischer Wirkung nach Anspruch 22 identifiziert; und

b) diese Verbindung zusammen mit geeigneten Hilfsmitteln zu Pflanzenschutzmitteln mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung formuliert.

30 24. Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder zur Regulation des Wachstums von Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens ein Verbindung gemäß Anspruch 21 oder 22 oder eine agrochemische Zusammensetzung enthaltend eine Verbindung gemäß Anspruch 21 oder 35 22 auf Pflanzen, deren Lebensraum und/oder auf Samen einwirken läßt.

25. Verfahren zur Erzeugung von Nukleinsäuresequenzen, welche für 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase kodieren, die durch Substanzen nach Anspruch 21 oder 22 nicht inhibiert werden, wobei die Nukleinsäuresequenz

i) ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten läßt; oder

5 ii) ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten läßt, und um mindestens 20 Aminosäuren am C-terminus und um mindestens 20 Aminosäuren am N-terminus verkürzt ist;

10

umfasst dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Prozessschritte umfaßt:

a) Expression des von der Nukleinsäuresequenz gemäß i) kodierten Proteins in einem heterologen System oder in einem zellfreien System;

5

b) randomisierte oder gerichtete Mutagenese des Proteins durch Modifikation der Nukleinsäure;

c) Messung der Interaktion des veränderten Genprodukts mit dem Herbizid;

20

d) Identifizierung von Derivaten des Proteins die eine geringere Interaktion aufweisen;

e) Testung der biologischen Aktivität des Proteins nach Applikation des Herbizides; und

25

f) Auswahl der Nukleinsäuresequenzen, die eine veränderte biologische Aktivität gegenüber dem Herbizid aufweisen.

30

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die gemäß Anspruch 25 f) ausgewählten Sequenzen in einen Organismus eingebracht werden.

27. Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen, die gegen Substanzen nach Anspruch 20 resistent sind, dadurch gekennzeichnet, daß in diesen Pflanzen mindestens eine Nukleinsäuresequenz, welche für 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase codiert, überexprimiert wird, wobei die Nukleinsäuresequenz

35

i) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 oder in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

40

ii) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2 oder in SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder

5      iii) ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3, das sich durch Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz, die eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 59% aufweist, ableiten lässt; oder

10      iv) eine Nukleinsäuresequenz gemäß i), ii) oder iii), welche um mindestens 20 Aminosäuren am C-terminus und um mindestens 20 Aminosäuren am N-terminus verkürzt ist; oder

v) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:5 oder in SEQ ID NO:7 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

5      vi) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:6 oder in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt;

20      umfasst, überexprimiert wird.

28. Transgene Pflanze hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 27.



## 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase als herbizides Target

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung der 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase, welche bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen sowie chlorotische Blätter bedingt als Target für Herbizide. In diesem Rahmen werden neue Nukleinsäuresequenzen umfassend die SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO: 7 sowie entsprechende funktionelle Äquivalente bereitgestellt. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase sowie dessen funktioneller Äquivalente in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung sowie die Verwendung dieser über das Verfahren identifizierten Verbindungen als Herbizide oder Wachstumsregulatoren.

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; BASF Aktiengesellschaft

5 &lt;120&gt; 2-Methyl-6-Solanylbenzochinon-Methyltransferase als herbizides Target

&lt;130&gt; 20030911

10 &lt;160&gt; 35

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

15 &lt;211&gt; 1355

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Nicotiana tabacum

&lt;220&gt;

20 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (110)..(1117)

&lt;223&gt;

25 &lt;400&gt; 1

ctttttttttc cgcttctcct ccaaaatccc atcaaaattg ataagcttct cttctgaagc 60

ttatcaaaac tatatgcagt aaaaaaata acatcaaaaa tacatatcc atg gct tct 118  
Met Ala Ser

30 1

tca ata cta agt gga gct gaa aat ttc aag att ctt agt ggt att tct 166  
Ser Ile Leu Ser Gly Ala Glu Asn Phe Lys Ile Leu Ser Gly Ile Ser  
5 10 15

35

cca tca gaa tta cac att aag tgt ttt cct caa aag ggt ctt gta aat 214  
Pro Ser Glu Leu His Ile Lys Cys Phe Pro Gln Lys Gly Leu Val Asn  
20 25 30 35

40

tac tca aga att cca aat acc aaa tca aga act cta aga aca aaa tgc 262  
Tyr Ser Arg Ile Pro Asn Thr Lys Ser Arg Thr Leu Arg Thr Lys Cys  
40 45 50

45

agt gta tca tct tca aga cca gct tca caa cca aga ttt ata caa cac 310  
Ser Val Ser Ser Ser Arg Pro Ala Ser Gln Pro Arg Phe Ile Gln His  
55 60 65

50

aaa aaa gaa gca ttt tgg ttt tac aga ttc tta tct ata gta tat gac 358  
Lys Lys Glu Ala Phe Trp Phe Tyr Arg Phe Leu Ser Ile Val Tyr Asp  
70 75 80

55

cat gtt ata aat cca ggt cat tgg act gaa gat atg aga gat gaa gca 406  
His Val Ile Asn Pro Gly His Trp Thr Glu Asp Met Arg Asp Glu Ala  
85 90 95

60

ctt gaa cca gct gaa tta aac agt aga caa ttg caa gtt gtg gat gtt 454  
Leu Glu Pro Ala Glu Leu Asn Ser Arg Gln Leu Gln Val Val Asp Val  
100 105 110 115ggg ggt ggt ggt act gga ttt act act ctt ggc att gtg aaa cat gtg gat 502  
Gly Gly Gly Thr Gly Phe Thr Thr Leu Gly Ile Val Lys His Val Asp  
120 125 130

gct aag aat gtt aca att att gat caa tca cct cat caa ctt gcc aag 550

## 2

Ala Lys Asn Val Thr Ile Ile Asp Gln Ser Pro His Gln Leu Ala Lys  
135 140 145

5 gct aga gaa aag gaa cct ttg aaa gaa tgt aag ata ttg gaa gga gat 598  
Ala Arg Glu Lys Glu Pro Leu Lys Glu Cys Lys Ile Leu Glu Gly Asp  
150 155 160

10 gct gag gat ttg cct ttt cct act gat act ttt gat aga tat gtt tct 646  
Ala Glu Asp Leu Pro Phe Pro Thr Asp Thr Phe Asp Arg Tyr Val Ser  
165 170 175

15 gct gga agc att gag tat tgg ccc gat cca cag cgc ggt atc aag gaa 694  
Ala Gly Ser Ile Glu Tyr Trp Pro Asp Pro Gln Arg Gly Ile Lys Glu  
180 185 190 195

gca tac cga gta ctg acc ata ggt ggt gtt gcc tgc tta ata ggt cct 742  
Ala Tyr Arg Val Leu Thr Ile Gly Gly Val Ala Cys Leu Ile Gly Pro  
200 205 210

20 gtg tac ccg acg ttt tgg cta tct cgt ttc ttt gca gat atg tgg atg 790  
Val Tyr Pro Thr Phe Trp Leu Ser Arg Phe Phe Ala Asp Met Trp Met  
215 220 225

25 ctc ttt cca aaa gaa gaa gaa tat ata gaa tgg ttc aaa aaa gct ggt 838  
Leu Phe Pro Lys Glu Glu Glu Tyr Ile Glu Trp Phe Lys Lys Ala Gly  
230 235 240

30 ttc gct caa gtt aaa ctc aag agg att ggc cca aaa tgg tat cgt ggt 886  
Phe Ala Gln Val Lys Leu Lys Arg Ile Gly Pro Lys Trp Tyr Arg Gly  
245 250 255

35 gtc cgt cgc cat ggc ttg atc atg ggt tgt tct gtg act ggt gtc aag 934  
Val Arg Arg His Gly Leu Ile Met Gly Cys Ser Val Thr Gly Val Lys  
260 265 270 275

cca tat ttt ggg gaa tct ccg ttg cag ctc ggc ccg aag gtt gag gat 982  
Pro Tyr Phe Gly Glu Ser Pro Leu Gln Leu Gly Pro Lys Val Glu Asp  
280 285 290

40 gtg agc aag cct gta aac cca ttc gca ttt ctc gtg cga ttc ctc ctc 1030  
Val Ser Lys Pro Val Asn Pro Phe Ala Phe Leu Val Arg Phe Leu Leu  
295 300 305

45 ggc ata act gct gca act tat tac gtg ctc gtt cca ata tac atg tgg 1078  
Gly Ile Thr Ala Ala Thr Tyr Tyr Val Leu Val Pro Ile Tyr Met Trp  
310 315 320

50 ctc aag gat caa atc acc ccg aaa ggt cag cca atc tga acaataagaa 1127  
Leu Lys Asp Gln Ile Thr Pro Lys Gly Gln Pro Ile  
325 330 335

gaacgtcaat ccaaagagaa gctctccaag cattctgttt gagagtacac cagtgaccac 1187

55 aaatctatca cggaacaaga aagtttttgg cgtcgttgca aggggtgaatt tgttgcttta 1247

gtttgttagt tttgcagcct tagaaagggc cttttgtaaa gtttaatttc atggtaaaac 1307

ctagaaatca ttgtgactat tttctagttg tataatctat cagtcatg 1355

60

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 335

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Nicotiana tabacum

&lt;400&gt; 2

5 Met Ala Ser Ser Ile Leu Ser Gly Ala Glu Asn Phe Lys Ile Leu Ser  
1 5 10 15

10 Gly Ile Ser Pro Ser Glu Leu His Ile Lys Cys Phe Pro Gln Lys Gly  
20 25 30

15 Leu Val Asn Tyr Ser Arg Ile Pro Asn Thr Lys Ser Arg Thr Leu Arg  
35 40 45

20 Thr Lys Cys Ser Val Ser Ser Ser Arg Pro Ala Ser Gln Pro Arg Phe  
50 55 60

25 Ile Gln His Lys Lys Glu Ala Phe Trp Phe Tyr Arg Phe Leu Ser Ile  
65 70 75 80

30 Val Tyr Asp His Val Ile Asn Pro Gly His Trp Thr Glu Asp Met Arg  
85 90 95

35 Asp Glu Ala Leu Glu Pro Ala Glu Leu Asn Ser Arg Gln Leu Gln Val  
100 105 110

40 Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Phe Thr Thr Leu Gly Ile Val Lys  
115 120 125

45 His Val Asp Ala Lys Asn Val Thr Ile Ile Asp Gln Ser Pro His Gln  
130 135 140

50 Leu Ala Lys Ala Arg Glu Lys Glu Pro Leu Lys Glu Cys Lys Ile Leu  
145 150 155 160

55 Glu Gly Asp Ala Glu Asp Leu Pro Phe Pro Thr Asp Thr Phe Asp Arg  
165 170 175

60 Tyr Val Ser Ala Gly Ser Ile Glu Tyr Trp Pro Asp Pro Gln Arg Gly  
180 185 190

65 Ile Lys Glu Ala Tyr Arg Val Leu Thr Ile Gly Gly Val Ala Cys Leu  
195 200 205

70 Ile Gly Pro Val Tyr Pro Thr Phe Trp Leu Ser Arg Phe Phe Ala Asp  
210 215 220

75 Met Trp Met Leu Phe Pro Lys Glu Glu Glu Tyr Ile Glu Trp Phe Lys  
225 230 235 240

Lys Ala Gly Phe Ala Gln Val Lys Leu Lys Arg Ile Gly Pro Lys Trp

4

245

250

255

5

Tyr Arg Gly Val Arg Arg His Gly Leu Ile Met Gly Cys Ser Val Thr  
260 265 270

10

Gly Val Lys Pro Tyr Phe Gly Glu Ser Pro Leu Gln Leu Gly Pro Lys  
275 280 285

15

Val Glu Asp Val Ser Lys Pro Val Asn Pro Phe Ala Phe Leu Val Arg  
290 295 300

Phe Leu Leu Gly Ile Thr Ala Ala Thr Tyr Tyr Val Leu Val Pro Ile  
305 310 315 320

20

Tyr Met Trp Leu Lys Asp Gln Ile Thr Pro Lys Gly Gln Pro Ile  
325 330 335

25

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1017

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

30

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1017)

&lt;223&gt;

35

&lt;400&gt; 3

atg gcc tct ttg atg ctc aac ggg gcc att acc ttc ccc aaa ggt tta  
Met Ala Ser Leu Met Leu Asn Gly Ala Ile Thr Phe Pro Lys Gly Leu  
1 5 10 15

40

ggg tcc cct ggt tcc aat ttg cat gcc aaa tcg att cct cgg ccg acc  
Gly Ser Pro Gly Ser Asn Leu His Ala Lys Ser Ile Pro Arg Pro Thr  
20 25 30 96

45

tta ctc tca gtt acc cga acc tcc aca cct aga ctc tcg gtg gct act  
Leu Leu Ser Val Thr Arg Thr Ser Thr Pro Arg Leu Ser Val Ala Thr  
35 40 45 144

50

aaa tgc agc agc agc agc gtg tcg tct tcc cgg cca tcg gcg caa cct  
Lys Cys Ser Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Arg Pro Ser Ala Gln Pro  
50 55 60 192

55

agg ttc att cag cac aag aag gag gct tac tgg ttc tac agg ttc tta  
Arg Phe Ile Gln His Lys Lys Glu Ala Tyr Trp Phe Tyr Arg Phe Leu  
65 70 75 80 240

tcc atc gta tac gac cat gtc atc aat cct ggg cat tgg acc gag gat  
Ser Ile Val Tyr Asp His Val Ile Asn Pro Gly His Trp Thr Glu Asp  
85 90 95 288

60

atg aga gac gac gct ctt gag cca gcg gat ctc agc cat ccg gac atg  
Met Arg Asp Asp Ala Leu Glu Pro Ala Asp Leu Ser His Pro Asp Met  
100 105 110 336

cga gtg gtc gat gtc ggc ggc gga act ggt ttc act act ctg ggc ata 384

Arg Val Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Phe Thr Thr Leu Gly Ile  
115 120 125

5     gtc aag aca gtg aag gcc aag aat gtg acc att ctg gac cag tcg cca                      432  
Val Lys Thr Val Lys Ala Lys Asn Val Thr Ile Leu Asp Gln Ser Pro  
      130                          135                          140

cat cag ctg gcc aaa gca aag caa aag gag ccg ttg aaa gaa tgc aag  
His Gln Leu Ala Lys Ala Lys Gln Lys Glu Pro Leu Lys Glu Cys Lys

10      145                  150                  155                  160                  480

atc gtc gag gga gat gct gag gat ctt cct ttt cca acc gat tat gct 528  
Ile Val Glu Gly Asp Ala Glu Asp Leu Pro Phe Pro Thr Asp Tyr Ala  
165 170 175

gac aga tac gtt tct gct gga agc att gag tac tgg ccg gac ccg cag 576  
Asp Arg Tyr Val Ser Ala Gly Ser Ile Glu Tyr Trp Pro Asp Pro Gln  
180 185 190

20 ...agg gga ata agg gaa gcg tac agg gtt ctc aag atc ggt gcc aaa gcg  
Arg Gly Ile Arg Glu Ala Tyr Arg Val Leu Lys Ile Gly Gly Lys Ala 624

195                          200                          205

25    tgt ctc atc ggc cct gtc tac cca acc ttc tgg ctc tct cgc ttc ttt     672  
Cys Leu Ile Gly Pro Val Tyr Pro Thr Phe Trp Leu Ser Arg Phe Phe  
            210                          215                          220

30 tct gat gtc tgg atg ctc ttc ccc aag gag gaa gag tac att gag tgg 720  
Ser Asp Val Trp Met Leu Phe Pro Lys Glu Glu Glu Tyr Ile Glu Trp  
225 230 235 240

ttc aag aat gcc ggt ttc aag gac gtt cag ctc aag agg att ggc ccc 768  
 Phe Lys Asn Ala Gly Phe Lys Asp Val Gln Ieu Lys Arg Ile Gly Pro  
 245 250 255

aag tgg tac cgt ggt gtt cgc agg cac ggc ctt atc atg gga tgt tct 816  
Lys Trp Tyr Arg Gly Val Arg Arg His Gly Leu Ile Met Gly Cys Ser  
260 265 270

40    gtc act, ggt, gtt aaa, cct gcc tcc ggt gat tct cct ctg cag, ctt: ggt      864  
Val, Thr Gly Val Lys Pro Ala Ser Gly Asp Ser Pro Leu Gln, Leu Gly

275                          280                          285

cca aag gaa gag gac gta gag aag cct gtc aac aac ccc ttc tcc ttc  
Pro Lys Glu Glu Asp Val Glu Lys Pro Val Asn Asn Pro Phe Ser Phe

290 295 300

**50**

ttg gga cgc ttc ctg gga act cta gca gct gcc tgg ttt gtg tta	960
Leu Gly Arg Phe Leu Leu Gly Thr Leu Ala Ala Ala Trp Phe Val Leu	
305                          310                          315                          320	

atc cct atc tac atg tgg atc aag gat cag atc gtt ccc aaa gac caa 100  
Ile Pro Ile Tyr Met Trp Ile Lys Asp Gln Ile Val Pro Lys Asp Gln  
325 330 335

```

ccc atc tga                                     101
Pro Ile

```

```
60      <210>  4
      <211> 338
      <212> PRT
      <213> Arabidopsis thaliana
```

&lt;400&gt; 4

5 Met Ala Ser Leu Met Leu Asn Gly Ala Ile Thr Phe Pro Lys Gly Leu  
1 5 10 15

10 Gly Ser Pro Gly Ser Asn Leu His Ala Lys Ser Ile Pro Arg Pro Thr  
20 25 30

Leu Leu Ser Val Thr Arg Thr Ser Thr Pro Arg Leu Ser Val Ala Thr  
35 40 45

15 Lys Cys Ser Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Arg Pro Ser Ala Gln Pro  
50 55 60

20 Arg Phe Ile Gln His Lys Lys Glu Ala Tyr Trp Phe Tyr Arg Phe Leu  
65 70 75 80

25 Ser Ile Val Tyr Asp His Val Ile Asn Pro Gly His Trp Thr Glu Asp  
85 90 95

30 Met Arg Asp Asp Ala Leu Glu Pro Ala Asp Leu Ser His Pro Asp Met  
100 105 110

Arg Val Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Phe Thr Thr Leu Gly Ile  
115 120 125

35 Val Lys Thr Val Lys Ala Lys Asn Val Thr Ile Leu Asp Gln Ser Pro  
130 135 140

40 His Gln Leu Ala Lys Ala Lys Gln Lys Glu Pro Leu Lys Glu Cys Lys  
145 150 155 160

45 Ile Val Glu Gly Asp Ala Glu Asp Leu Pro Phe Pro Thr Asp Tyr Ala  
165 170 175

50 Asp Arg Tyr Val Ser Ala Gly Ser Ile Glu Tyr Trp Pro Asp Pro Gln  
180 185 190

Arg Gly Ile Arg Glu Ala Tyr Arg Val Leu Lys Ile Gly Gly Lys Ala  
195 200 205

55 Cys Leu Ile Gly Pro Val Tyr Pro Thr Phe Trp Leu Ser Arg Phe Phe  
210 215 220

60 Ser Asp Val Trp Met Leu Phe Pro Lys Glu Glu Glu Tyr Ile Glu Trp  
225 230 235 240

Phe Lys Asn Ala Gly Phe Lys Asp Val Gln Leu Lys Arg Ile Gly Pro

245

250

255

5

Lys Trp Tyr Arg Gly Val Arg Arg His Gly Leu Ile Met Gly Cys Ser  
260 265 270

10

Val Thr Gly Val Lys Pro Ala Ser Gly Asp Ser Pro Leu Gln Leu Gly  
275 280 285

15

Pro Lys Glu Glu Asp Val Glu Lys Pro Val Asn Asn Pro Phe Ser Phe  
290 295 300

Leu Gly Arg Phe Leu Leu Gly Thr Leu Ala Ala Ala Trp Phe Val Leu  
305 310 315 320

20

Ile Pro Ile Tyr Met Trp Ile Lys Asp Gln Ile Val Pro Lys Asp Gln  
325 330 335

25

Pro Ile

30

<210> 5  
<211> 774  
<212> DNA  
<213> Arabidopsis thaliana

35

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(774)  
<223>

40

<400> 5  
tgc agc agc agc agc gtg tgc tct tcc cgg cca tgc gcg caa cct agg 48  
Cys Ser Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Arg Pro Ser Ala Gln Pro Arg  
1 5 10 15

45

ttc att cag cac aag aag gag gct tac tgg ttc tac agg ttc tta tcc 96  
Phe Ile Gln His Lys Lys Glu Ala Tyr Trp Phe Tyr Arg Phe Leu Ser  
20 25 30

50

atc gta tac gac cat gtc atc aat cct ggg cat tgg acc gag gat atg 144  
Ile Val Tyr Asp His Val Ile Asn Pro Gly His Trp Thr Glu Asp Met  
35 40 45

55

aga gac gac gct ctt gag cca gcg gat ctg agc cat ccg gac atg cga 192  
Arg Asp Asp Ala Leu Glu Pro Ala Asp Leu Ser His Pro Asp Met Arg  
50 55 60

gtg gtc gat gtc ggc ggc gga act ggt ttc act act ctg ggc ata gtc 240  
Val Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Phe Thr Thr Leu Gly Ile Val  
65 70 75 80

60

aag aca gtg aag gcc aag aat gtg acc att ctg gac cag tgc cca cat 288  
Lys Thr Val Lys Ala Lys Asn Val Thr Ile Leu Asp Gln Ser Pro His  
85 90 95

cag ctg gcc aaa gca aag caa aag gag ccg ttg aaa gaa tgc aag atc 336



## 8

Gln Leu Ala Lys Ala Lys Gln Lys Glu Pro Leu Lys Glu Cys Lys Ile  
 100 105 110

5 gtc gag gga gat gct gag gat ctt cct ttt cca acc gat tat gct gac 384  
 Val Glu Gly Asp Ala Glu Asp Leu Pro Phe Pro Thr Asp Tyr Ala Asp  
 115 120 125

10 aga tac gtt tct gct gga agc att gag tac tgg ccg gac ccg cag agg 432  
 Arg Tyr Val Ser Ala Gly Ser Ile Glu Tyr Trp Pro Asp Pro Gln Arg  
 130 135 140

15 gga ata agg gaa gcg tac agg gtt ctc aag atc ggt ggc aaa gcg tgt 480  
 Gly Ile Arg Glu Ala Tyr Arg Val Leu Lys Ile Gly Gly Lys Ala Cys  
 145 150 155 160

ctc atc ggc cct gtc tac cca acc ttc tgg ctc tct cgc ttc ttt tct 528  
 Leu Ile Gly Pro Val Tyr Pro Thr Phe Trp Leu Ser Arg Phe Phe Ser  
 165 170 175

20 gat gtc tgg atg ctc ttc ccc aag gag gaa gag tac att gag tgg ttc 576  
 Asp Val Trp Met Leu Phe Pro Lys Glu Glu Glu Tyr Ile Glu Trp Phe  
 180 185 190

25 aag aat gcc ggt ttc aag gac gtt cag ctc aag agg att ggc ccc aag 624  
 Lys Asn Ala Gly Phe Lys Asp Val Gln Leu Lys Arg Ile Gly Pro Lys  
 195 200 205

30 tgg tac cgt ggt gtt cgc agg cad ggc ctt atc atg gga tgt tct gtc 672  
 Trp Tyr Arg Gly Val Arg Arg His Gly Leu Ile Met Gly Cys Ser Val  
 210 215 220

act ggt gtt aaa cct gcc tcc ggt gat tct cct ctc cag ctt ggt cca 720  
 Thr Gly Val Lys Pro Ala Ser Gly Asp Ser Pro Leu Gln Leu Gly Pro  
 225 230 235 240

35 aag gaa gag gac gta gag aag cct gtc aac aac ccc ttc tcc ttc ttg 768  
 Lys Glu Glu Asp Val Glu Lys Pro Val Asn Asn Pro Phe Ser Phe Leu  
 245 250 255

40 gga cgc 774  
 Gly Arg

45 <210> 6  
 <211> 258  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

50 <400> 6

Cys Ser Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Arg Pro Ser Ala Gln Pro Arg  
 1 5 10 15

55 Phe Ile Gln His Lys Lys Glu Ala Tyr Trp Phe Tyr Arg Phe Leu Ser  
 20 25 30

60 Ile Val Tyr Asp His Val Ile Asn Pro Gly His Trp Thr Glu Asp Met  
 35 40 45

Arg Asp Asp Ala Leu Glu Pro Ala Asp Leu Ser His Pro Asp Met Arg

## 9.

50

55

60

5 Val Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Phe Thr Thr Leu Gly Ile Val  
65 70 75 80

10 Lys Thr Val Lys Ala Lys Asn Val Thr Ile Leu Asp Gln Ser Pro His  
85 90 95

Gln Leu Ala Lys Ala Lys Gln Lys Glu Pro Leu Lys Glu Cys Lys Ile  
100 105 110

15 Val Glu Gly Asp Ala Glu Asp Leu Pro Phe Pro Thr Asp Tyr Ala Asp  
115 120 125

20 Arg Tyr Val Ser Ala Gly Ser Ile Glu Tyr Trp Pro Asp Pro Gln Arg  
130 135 140

25 Gly Ile Arg Glu Ala Tyr Arg Val Leu Lys Ile Gly Gly Lys Ala Cys  
145 150 155 160

30 Leu Ile Gly Pro Val Tyr Pro Thr Phe Trp Leu Ser Arg Phe Phe Ser  
165 170 175

35 Asp Val Trp Met Leu Phe Pro Lys Glu Glu Glu Tyr Ile Glu Trp Phe  
180 185 190

Lys Asn Ala Gly Phe Lys Asp Val Gln Leu Lys Arg Ile Gly Pro Lys  
195 200 205

40 Trp Tyr Arg Gly Val Arg Arg His Gly Leu Ile Met Gly Cys Ser Val  
210 215 220

45 Thr Gly Val Lys Pro Ala Ser Gly Asp Ser Pro Leu Gln Leu Gly Pro  
225 230 235 240

Lys Glu Glu Asp Val Glu Lys Pro Val Asn Asn Pro Phe Ser Phe Leu  
245 250 255

50

Gly Arg

55

<210> 7  
<211> 768  
<212> DNA  
<213> Arabidopsis thaliana

60

<220>  
<221> CDS  
<222> (1) .. (768)  
<223>

<400> 7																	
5	agc	agc	agc	gtg	tgc	tct	tcc	cgg	cca	tgc	gcg	caa	cct	agg	ttc	att	48
	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Arg	Pro	Ser	Ala	Gln	Pro	Arg	Phe	Ile	
	1				5					10					15		
10	cag	cac	aag	aag	gag	gct	tac	tgg	ttc	tac	agg	ttc	tta	tcc	atc	gta	96
	Gln	His	Lys	Lys	Glu	Ala	Tyr	Trp	Phe	Tyr	Arg	Phe	Leu	Ser	Ile	Val	
				20					25					30			
15	tac	gac	cat	gtc	atc	aat	cct	ggg	cat	tgg	acc	gag	gat	atg	aga	gac	144
	Tyr	Asp	His	Val	Ile	Asn	Pro	Gly	His	Trp	Thr	Glu	Asp	Met	Arg	Asp	
			35					40					45				
20	gac	gct	ctt	gag	cca	gcg	gat	ctc	agc	cat	ccg	gac	atg	cga	gtg	gtc	192
	Asp	Ala	Leu	Glu	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	His	Pro	Asp	Met	Arg	Val	Val	
		50					55					60					
25	gat	gtc	ggc	ggc	gga	act	ggt	ttc	act	act	ctg	ggc	ata	gtc	aag	aca	240
	Asp	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Thr	Leu	Gly	Ile	Val	Lys	Thr	
		65				70					75				80		
30	gtg	aag	gcc	aag	aat	gtg	acc	att	ctg	gac	cag	tgc	cca	cat	cag	ctg	288
	Val	Lys	Ala	Lys	Asn	Val	Thr	Ile	Leu	Asp	Gln	Ser	Pro	His	Gln	Leu	
					85				90						95		
35	gcc	aaa	gca	aag	caa	aag	gag	cgc	ttg	aaa	gaa	tgc	aag	atc	gtc	gag	336
	Ala	Lys	Ala	Lys	Gln	Lys	Glu	Pro	Leu	Lys	Glu	Cys	Lys	Ile	Val	Glu	
				100					105					110			
40	gga	gat	gct	gag	gat	ctt	cct	ttt	cca	acc	gat	tat	gct	gac	aga	tac	384
	Gly	Asp	Ala	Glu	Asp	Leu	Pro	Phe	Pro	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Arg	Tyr	
			115					120					125				
45	gtt	tct	gct	gga	agc	att	gag	tac	tgg	cgc	gac	ccg	cag	agg	gga	ata	432
	Val	Ser	Ala	Gly	Ser	Ile	Glu	Tyr	Trp	Pro	Asp	Pro	Gln	Arg	Gly	Ile	
		130					135					140					
50	agg	gaa	gcg	tac	agg	gtt	ctc	aag	atc	ggt	ggc	aaa	gcg	tgt	ctc	atc	480
	Arg	Glu	Ala	Tyr	Arg	Val	Leu	Lys	Ile	Gly	Gly	Lys	Ala	Cys	Leu	Ile	
		145				150					155				160		
55	ggc	cct	gtc	tac	cca	acc	ttc	tgg	ctc	tct	cgc	ttc	ttt	tct	gat	gtc	528
	Gly	Pro	Val	Tyr	Pro	Thr	Phe	Trp	Leu	Ser	Arg	Phe	Phe	Ser	Asp	Val	
					165				170						175		
60	tgg	atg	ctc	ttc	ccc	aag	gag	gaa	gag	tac	att	gag	tgg	ttc	aag	aat	576
	Trp	Met	Leu	Phe	Pro	Lys	Glu	Glu	Glu	Tyr	Ile	Glu	Trp	Phe	Lys	Asn	
				180					185					190			
65	gcc	ggt	ttc	aag	gac	gtt	cag	ctc	aag	agg	att	ggc	ccc	aag	tgg	tac	624
	Ala	Gly	Phe	Lys	Asp	Val	Gln	Leu	Lys	Arg	Ile	Gly	Pro	Lys	Trp	Tyr	
			195					200					205				
70	cgt	ggt	gtt	cgc	agg	cac	ggc	ctt	atc	atg	gga	tgt	tct	gtc	act	ggt	672
	Arg	Gly	Val	Arg	Arg	His	Gly	Leu	Ile	Met	Gly	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	
		210					215					220					
75	gtt	aaa	cct	gcc	tcc	ggt	gat	tct	cct	ctc	cag	ctt	ggt	cca	aag	gaa	720
	Val	Lys	Pro	Ala	Ser	Gly	Asp	Ser	Pro	Leu	Gln	Leu	Gly	Pro	Lys	Glu	
		225				230					235				240		
80	gag	gac	gta	gag	aag	cct	gtc	aac	aac	ccc	ttc	tcc	ttc	ttg	gga	cgc	768

## 11

Glu Asp Val Glu Lys Pro Val Asn Asn Pro Phe Ser Phe Leu Gly Arg  
245 250 255

5 <210> 8  
<211> 256  
<212> PRT  
<213> Arabidopsis thaliana

10 <400> 8

Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Arg Pro Ser Ala Gln Pro Arg Phe Ile  
1 5 10 15

15

Gln His Lys Lys Glu Ala Tyr Trp Phe Tyr Arg Phe Leu Ser Ile Val  
20 25 30

20

Tyr Asp His Val Ile Asn Pro Gly His Trp Thr Glu Asp Met Arg Asp  
35 40 45

25

Asp Ala Leu Glu Pro Ala Asp Leu Ser His Pro Asp Met Arg Val Val  
50 55 60

30

Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Phe Thr Thr Leu Gly Ile Val Lys Thr  
65 70 75 80

35

Val Lys Ala Lys Asn Val Thr Ile Leu Asp Gln Ser Pro His Gln Leu  
85 90 95

40

Ala Lys Ala Lys Gln Lys Glu Pro Leu Lys Glu Cys Lys Ile Val Glu  
100 105 110

45

Gly Asp Ala Glu Asp Leu Pro Phe Pro Thr Asp Tyr Ala Asp Arg Tyr  
115 120 125

50

Val Ser Ala Gly Ser Ile Glu Tyr Trp Pro Asp Pro Gln Arg Gly Ile  
130 135 140

55

Arg Glu Ala Tyr Arg Val Leu Lys Ile Gly Gly Lys Ala Cys Leu Ile  
145 150 155 160

60

Gly Pro Val Tyr Pro Thr Phe Trp Leu Ser Arg Phe Phe Ser Asp Val  
165 170 175

65

Trp Met Leu Phe Pro Lys Glu Glu Glu Tyr Ile Glu Trp Phe Lys Asn  
180 185 190

70

Ala Gly Phe Lys Asp Val Gln Leu Lys Arg Ile Gly Pro Lys Trp Tyr  
195 200 205

Arg Gly Val Arg Arg His Gly Leu Ile Met Gly Cys Ser Val Thr Gly

## 12

210

215

220

5 Val Lys Pro Ala Ser Gly Asp Ser Pro Leu Gln Leu Gly Pro Lys Glu  
225 230 235 240

10 Glu Asp Val Glu Lys Pro Val Asn Asn Pro Phe Ser Phe Leu Gly Arg  
245 250 255

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 910

&lt;212&gt; DNA

15 <213> Nicotiana tabacum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

20 <222> (1)..(600)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 9

25 gcg gcc gct gat caa tca cct cat caa ctt gcc aag gct aga gaa aag 48  
Ala Ala Ala Asp Gln Ser Pro His Gln Leu Ala Lys Ala Arg Glu Lys  
1 5 10 15

30 gaa cct ttg aaa gaa tgt aag ata ttg gaa gga gat gct gag gat ttg 96  
Gln Pro Leu Lys Glu Cys Lys Ile Leu Glu Gly Asp Ala Glu Asp Leu  
20 25 30

35 cct ttt cct act gat act ctt gat aga tat gtt tct gct gga ggc att 144  
Pro Phe Pro Thr Asp Thr Leu Asp Arg Tyr Val Ser Ala Gly Gly Ile  
35 40 45

gag tat tgg ccc gat cca cag cgc ggt atc aag gaa gca tac cga gta 192  
Glu Tyr Trp Pro Asp Pro Gln Arg Gly Ile Lys Glu Ala Tyr Arg Val  
50 55 60

40 ctg acc ata ggt ggt gtt gcc tgc tta ata ggt cct gtg tac ccg acg 240  
Leu Thr Ile Gly Gly Val Ala Cys Leu Ile Gly Pro Val Tyr Pro Thr  
65 70 75 80

45 ttt tgg cta tct cgt ttc ttt gca gat atg tgg atg ctc ttt cca aaa 288  
Phe Trp Leu Ser Arg Phe Phe Ala Asp Met Trp Met Leu Phe Pro Lys  
85 90 95

50 gaa gaa gaa tat ata gaa tgg ttc aaa aaa gct ggt ttc gct caa gtt 336  
Glu Glu Glu Tyr Ile Glu Trp Phe Lys Lys Ala Gly Phe Ala Gln Val  
100 105 110

aaa ctc aag agg att ggc cca aaa tgg tat cgt ggt gtc tgt cgc cat 384  
Lys Leu Lys Arg Ile Gly Pro Lys Trp Tyr Arg Gly Val Cys Arg His  
115 120 125

55 ggc ttg atc atg ggt tgt tct gtg act ggt gtc aag cca tat ttt ggg 432  
Gly Leu Ile Met Gly Cys Ser Val Thr Gly Val Lys Pro Tyr Phe Gly  
130 135 140

60 gaa tct ccg ttg cag ctc ggt ccg aag gtt gag gat gtg agc aag cct 480  
Glu Ser Pro Leu Gln Leu Gly Pro Lys Val Glu Asp Val Ser Lys Pro  
145 150 155 160

gta aac cca ttc gta ttt ctc gtg cga ttc ctc ctt ggc ata act gct 528

## 13

Val Asn Pro Phe Val Phe Leu Val Arg Phe Leu Leu Gly Ile Thr Ala  
165 170 175

5 gca act tat tac gtg ctc gtt cca ata tac atg tgg ctc aag gat caa 576  
Ala Thr Tyr Tyr Val Leu Val Pro Ile Tyr Met Trp Leu Lys Asp Gln  
180 185 190

10 atc acc ccg aaa ggt cag cca atc tgaacaataa gaagaacgtc aatccaaaga 630  
Ile Thr Pro Lys Gly Gln Pro Ile  
195 200

gaagctctcc aagcattctg tttgagagta caccagtgac cacaaatcta tcacggaaca 690

15 agaaagtttt tggcgtcgtt gcaagggtga atttggttgc ttagtttggt agttttgcag 750

ccttagaaaag ggccttttgt aaagttaa ttcattggtga aacctagaaa tcattgtgac 810

tattttctag ttgtataatc tatcagtcac gttcttttat caccagttga gaaaactcgt 870

20 cgaaataaat accagtaata cggtatttgc cagcgccgc 910

<210> 10

<211> 200

25 <212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 10

30 Ala Ala Ala Asp Gln Ser Pro His Gln Leu Ala Lys Ala Arg Glu Lys  
1 5 10 15

35 Glu Pro Leu Lys Glu Cys Lys Ile Leu Glu Gly Asp Ala Glu Asp Leu  
20 25 30

40 Pro Phe Pro Thr Asp Thr Leu Asp Arg Tyr Val Ser Ala Gly Gly Ile  
35 40 45

Glu Tyr Trp Pro Asp Pro Gln Arg Gly Ile Lys Glu Ala Tyr Arg Val  
50 55 60

45 Leu Thr Ile Gly Gly Val Ala Cys Leu Ile Gly Pro Val Tyr Pro Thr  
65 70 75 80

50 Phe Trp Leu Ser Arg Phe Phe Ala Asp Met Trp Met Leu Phe Pro Lys  
85 90 95

55 Glu Glu Glu Tyr Ile Glu Trp Phe Lys Lys Ala Gly Phe Ala Gln Val  
100 105 110

60 Lys Leu Lys Arg Ile Gly Pro Lys Trp Tyr Arg Gly Val Cys Arg His  
115 120 125

Gly Leu Ile Met Gly Cys Ser Val Thr Gly Val Lys Pro Tyr Phe Gly  
130 135 140

## 14

Glu Ser Pro Leu Gln Leu Gly Pro Lys Val Glu Asp Val Ser Lys Pro  
145 150 155 160

5

Val Asn Pro Phe Val Phe Leu Val Arg Phe Leu Leu Gly Ile Thr Ala  
165 170 175

10

Ala Thr Tyr Tyr Val Leu Val Pro Ile Tyr Met Trp Leu Lys Asp Gln  
180 185 190

15

Ile Thr Pro Lys Gly Gln Pro Ile  
195 200

20

<210> 11  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

25

<220>  
<223> Primer

<400> 11  
agaattcggc gccgct

16

30

<210> 12  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

35

<220>  
<223> Primer

<400> 12  
ctcatgcgcc gcgcgcgaac gcaattaatg tg

32

40

<210> 13  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

45

<220>  
<223> Primer

50

<400> 13  
tcatgcgcc gcgagatcca gttcgatgta ac

32

55

<210> 14  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

60

<220>  
<223> Primer

<400> 14  
gtggattgat gtgatatctc c

21

5 <210> 15  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Primer

10 <400> 15  
gtaaggatct gagctacaca t

21

15 <210> 16  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

20 <220>  
<223> Primer

<400> 16  
atggcctcctt tgatgctcaa cg

22

25 <210> 17  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

30 <220>  
<223> Primer

35 <400> 17  
gatgggttgg tctttgggaa cg

22

40 <210> 18  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

45 <220>  
<223> Primer

<400> 18  
cctcttctca acttggtgga tc

22

50 <210> 19  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

55 <220>  
<223> Primer

60 <400> 19  
ggggtttaca atgatacaat gatc

24

<210> 20  
<211> 18  
<212> DNA



<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

5

<400> 20

atgagcagca gcgtgtcg

18

10

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

15

<220>

<223> Primer

<400> 21

gcgtcccaag aaggagaagg

20

20

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

25

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

30

<400> 22

atgtgcagca gcagcagc

18

35

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

40

<220>

<223> Primer

<400> 23

gcgtcccaag aaggagaagg

20

45

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

50

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

55

<400> 24

atgtgcagca gcagcagc

18

60

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25  
tcagcgtccc aagaaggag

19

5

<210> 26  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

10

<220>  
<223> Primer

15

<400> 26  
atgagcagca gcgtgtcg

18

<210> 27  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

20

<220>  
<223> Primer

25

<400> 27  
tcagatgggt tggctcttgg

20

30

<210> 28  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

35

<220>  
<223> Primer

<400> 28  
atgagcagca gcgtgtcg

40

18

<210> 29  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

45

<220>  
<223> Primer

50

<400> 29  
gatgggttgg tctttggga

19

55

<210> 30  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

60

<220>  
<223> Primer

<400> 30  
atgtgcagca gcagcagc

18

18

5 <210> 31  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
  
<220>  
<223> Primer  
  
10 <400> 31  
gatgggttgg tctttggga 19  
  
15 <210> 32  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
  
20 <220>  
<223> Primer  
  
<400> 32  
atgagcagca gcgtgtcg 18  
  
25 <210> 33  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
  
30 <220>  
<223> Primer  
  
<400> 33  
35 tcagcgtccc aagaaggag 19  
  
40 <210> 34  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
  
45 <220>  
<223> Primer  
  
<400> 34  
atgtgcagca gcagcagc 18  
  
50 <210> 35  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
  
55 <220>  
<223> Primer  
  
<400> 35  
60 gaaggatcag atgggttggc c 21

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**